

540619

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 15 日 (15.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/058789 A1

(51) 国際特許分類<sup>7</sup>: C07H 15/26, C08B 37/00, G01N 30/48

市 川内町加賀須野 4 6 3 大塚化学株式会社研究技  
術センター内 Tokushima (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/016682

(22) 国際出願日: 2003 年 12 月 25 日 (25.12.2003)

(74) 代理人: 田村 巖 (TAMURA, Iwao); 〒561-0872 大阪府  
豊中市 寺内 1 丁目 9 番 2 2 号 田村特許事務所 Osaka  
(JP).

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:  
特願 2002-377819  
2002 年 12 月 26 日 (26.12.2002) JP

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,  
BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,  
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 大塚化学  
株式会社 (OTSUKA CHEMICAL CO., LTD.) [JP/JP];  
〒540-0021 大阪府 大阪市 中央区大手通 3 丁目 2 番  
2 7 号 Osaka (JP).

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (BW, GH, GM, KE, LS,  
MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特  
許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッ  
パ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 梶原 康宏 (KAJIHARA, Yasuhiro) [JP/JP];  
〒224-0014 神奈川県 横浜市 都筑区 牛久保東  
2-4-2-205 Kanagawa (JP).

添付公開書類:  
— 国際調査報告書

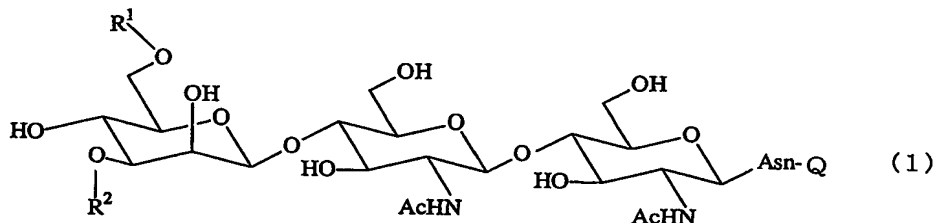
(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 掛樋 一晃  
(KAKEHI, Kazuaki) [JP/JP]; 〒630-8113 奈良県 奈  
良市 法蓮町北 1-1226 Nara (JP). 深江 一博  
(FUKAE, Kazuhiro) [JP/JP]; 〒771-0193 徳島県 徳島

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される  
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語  
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: SUGAR-CHAIN ASPARAGINE DERIVATIVES AND PROCESSES FOR THE PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: 糖鎖アスパラギン誘導体およびその製造方法



(57) Abstract: Sugar-chain asparagine derivatives having undeca- to tri-saccharides as represented by the general formula (1): (1) [wherein R<sup>1</sup> and R<sup>2</sup> are each independently hydrogen or a group represented by one of the general formulae (2) to (6) set forth in the description; and Q is a biotinyl group or an FITC group]; sugar-chain asparagine derivatives wherein the amino nitrogen of asparagine is modified with a biotinyl group or an FITC group and at least one fucose molecule is bonded to the N-acetyl- glucosamine on the nonreducing end side; microplates to which biotinylated sugar-chain asparagines are bonded; and affinity columns to which biotinylated sugar-chain asparagines are bonded.

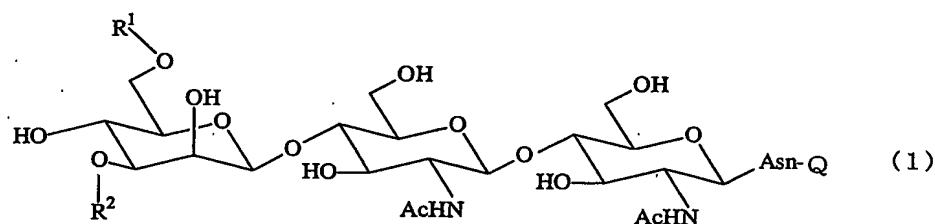
[続葉有]

WO 2004/058789 A1



(57) 要約:

下記式 (1) で表される 1 1 ~ 3 糖を有する糖鎖アスパラギン誘導体、



〔式中、 $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、明細書記載の式 (2) ~ (6) で示される基であり、同一でも異なってもよい。Qはビオチン基又はFITC基を示す。〕

ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体、ビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレート、並びにビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラム。

## 明 細 書

## 糖鎖アスパラギン誘導体およびその製造方法

## 5 技術分野

本発明はビオチン化糖鎖アスパラギン、フルオレセインイソチシアネート(FITC) 化糖鎖アスパラギン、それらの製造方法及びその用途に関する。

## 背景技術

- 10 近年、核酸(DNA)、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されてきている。ヒトの体は、約60兆個の細胞から成っている一大細胞社会であり、全ての細胞表面は糖鎖分子によって覆われている。例えば、ABO式血液型は細胞表面の糖鎖の違いにより決定されている。

- 15 糖鎖は、細胞間の認識や相互作用に関わる働きをもち、細胞社会を成り立たせる要となっている。細胞社会の乱れは、癌、慢性疾患、感染症、老化などにつながる。

例えば、細胞が癌化すると糖鎖の構造変化が起こることが分かっている。また、コレラ菌やインフルエンザウイルスなどは、ある特定の糖鎖を認識し結合することにより、細胞に侵入し感染することが知られている。

- 20 糖鎖は単糖の配列、結合様式・部位、鎖の長さ・分岐様式、全体の高次構造などの多様性から、核酸やタンパク質の構造と比べると非常に複雑な構造である。従って、その構造に由来する生物学的な情報は核酸やタンパク質に比べて多種多様である。糖鎖は、研究の重要性を認識されながらも、その構造の複雑さや多様性により、核酸やタンパク質に比べて研究の推進が遅れている状況にある。

- 25 上述のようにある特定の糖鎖とタンパク質とが認識し結合能を有しているかを解明することにより、新しい原理に基づく医薬品や食品の開発などをもたらす、

病気の予防、治療に貢献するなど、幅広い応用が期待されている。

そこで、ビオチン・アビジンの結合特異性を利用し、ビオチン化した複数の糖鎖をアビジン化されたマイクロプレート上で反応させるだけで簡単に糖鎖マイクロチップを製造することができる。これにより、特定の糖鎖と結合能を有するタンパク質を解明することができる。

また、ある特定のタンパク質を分離精製する目的で、アビジン化したアフィニティーカラムに特定のビオチン化した糖鎖を結合し固定化し、そこに、ビオチン化した糖鎖と特異的結合能を有するタンパク質を含む混合物を通すことにより目的とするタンパク質のみを単離することができる。

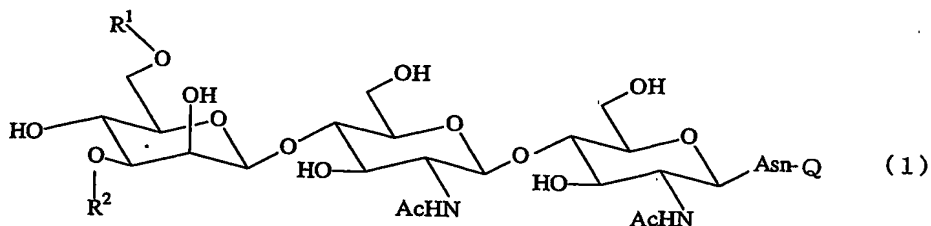
またFITC化した糖鎖アスパラギンは、キャピラリー電気泳動法等により微量であっても単離することができる。更にそれからFITCをはずして糖鎖アスパラギン自身を単離することもできる。

本発明の課題は、アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化又はFITC化した糖鎖アスパラギン、その製造方法及びその用途を提供することにある。

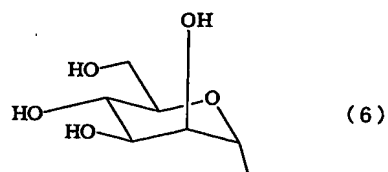
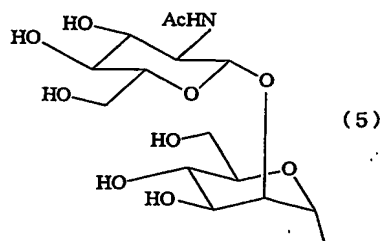
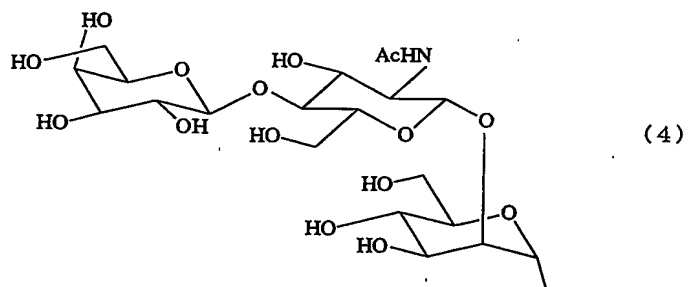
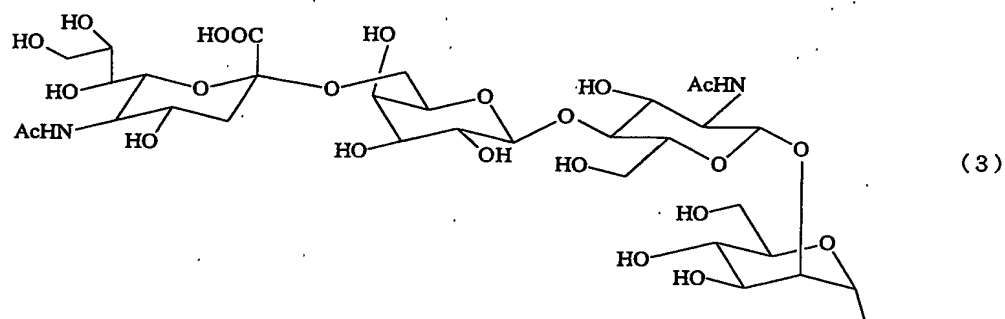
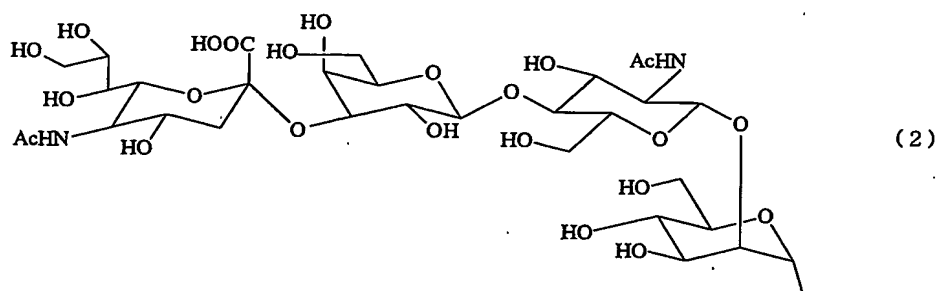
## 発明の開示

本発明は、下記の発明に係る。

1. 下記式(1)で表される11～3糖を有する糖鎖アスパラギン誘導体。

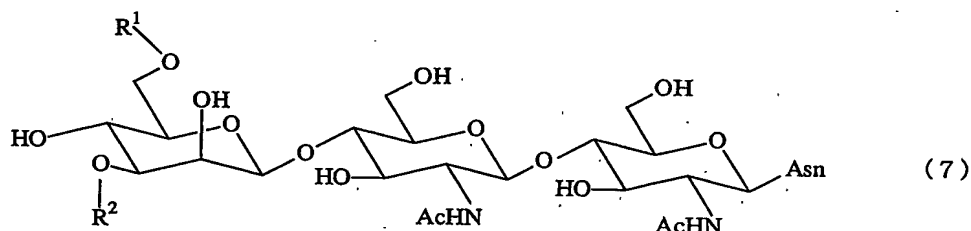


[式中、 $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、式(2)～(6)で示される基であり、同一でも異なってもよい。Qはビオチン基又はFITC基を示す。]



2. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

3. 式(9)で表される11~3糖を有する糖鎖アスパラギンをビオチン化することを特徴とするビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法。



〔式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記に同じ。〕

4. 式(9)で表される11~3糖を有する糖鎖アスパラギンをフルオレセインイソチオシアネート(FITC)化することを特徴とするFITC化糖鎖アスパラギンの製造方法。

5. 上記のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレート。

6. 上記のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラム。

本発明者は、先に特願2001-185685号(以下、先願という)において、種々の単離された糖鎖アスパラギン誘導体を従来に比べて非常に容易かつ大量に得ることができる、糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖の製造方法、更には糖残基が任意に欠失した糖鎖が結合した新規な糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン、糖鎖を開発した。

この先願の方法は例えば

(1) (a) 1種もしくは2種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、  
ならびに

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、  
を含む、糖鎖アスパラギン由来の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

5 (2) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程をさらに含む前記 (1) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(3) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および／または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (1) または (2) 記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、  
10

(4) 脂溶性の保護基がフルオレニルメトキシカルボニル (Fmoc) 基である前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、

(5) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (1) ~ (3) いずれか記載の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法、  
15

(6) (a) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程、  
20

(b) 該糖鎖アスパラギン誘導体混合物または該糖鎖アスパラギン誘導体混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解して得られる混合物をクロマトグラフィーに供して各糖鎖アスパラギン誘導体を分離する工程、ならびに

25 (c) 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去して糖鎖アスパラギンを得る工程、

を含む、糖鎖アスパラギンの製造方法、

(7) (b') 工程 (b) で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、および/または

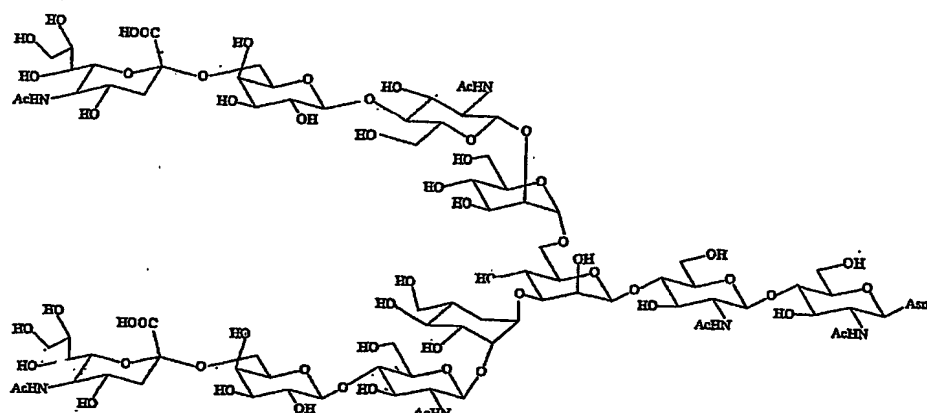
(c') 工程 (c) で得られた糖鎖アスパラギンを糖加水分解酵素を用いて加水分解する工程、

をさらに含む、前記 (6) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(8) 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物が、下記式 (A) の化合物および/または該化合物において 1 以上の糖残基が欠失した化合物を含むものである、前記 (6) または (7) 記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

10 (9) 脂溶性の保護基が Fmoc 基である前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法、

(10) 工程 (a) が、非還元末端にシアル酸残基を有する 1 種もしくは 2 種以上の糖鎖アスパラギンを含む混合物に含まれる該糖鎖アスパラギンに Fmoc 基を導入し、かつシアル酸残基にベンジル基を導入して糖鎖アスパラギン誘導体混合物を得る工程である、前記 (6) ~ (8) いずれか記載の糖鎖アスパラギンの製造方法などである。



(A)

これら糖鎖アスパラギン誘導体及び糖鎖アスパラギンの製造についての詳細は、上記先願に述べられているので、これを引用する。しかし若干先願の内容について述べると、先願の糖鎖アスパラギン誘導体の製造方法は、たとえば、天然の糖



タンパク質に由来する糖鎖アスパラギン、好ましくはアスパラギン結合型糖鎖から得られる糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入（結合）して糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を得た後に当該混合物を各糖鎖アスパラギン誘導体に分離することを1つの大きな特徴とする。なお、本明細書において、「糖鎖アスパラギン」とはアスパラギンが結合した状態の糖鎖をいう。また、「アスパラギン結合型糖鎖」とはタンパク質のポリペプチド中のアスパラギン（Asn）の酸アミノ基に、還元末端に存在するN-アセチルグルコサミンがN-グリコシド結合した糖鎖群であって、Man ( $\beta$ 1-4), GlcNac ( $\beta$ 1-4) GlcNacを母核とする糖鎖群をいう。「糖鎖アスパラギン誘導体」とはアスパラギン残基に脂溶性の保護基が結合した状態の糖鎖アスパラギンをいう。また、化合物の構造式中、「AcHN」はアセトアミド基を示す。

前記するように、天然の糖タンパク質に由来する糖鎖は非還元末端の糖残基がランダムに欠失した糖鎖の混合物である。本発明者らは、意外にも天然の糖タンパク質に由来する糖鎖、具体的には糖鎖アスパラギンの混合物に含まれる当該糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入することで、当該保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物を公知のクロマトグラフィーの手法を用いて容易に個々の糖鎖アスパラギン誘導体に分離することができることを見出した。それにより、種々の構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ大量に調製することが可能となった。たとえば、従来分離が困難であった類似構造の糖鎖アスパラギン誘導体同士の分離が可能となり、それらの化合物を各々、容易かつ大量に調製することができる。また、得られた糖鎖アスパラギン誘導体を元に、たとえば、糖加水分解酵素を順次作用させて糖残基を除去することにより、さらに様々な糖鎖アスパラギン誘導体を合成することもできる。

このように、糖鎖アスパラギンに脂溶性の保護基を導入して誘導体化することにより個々の糖鎖アスパラギン誘導体の分離が可能となったが、これは、脂溶性

の保護基を導入したことにより糖鎖アスパラギン誘導体の全体の脂溶性が高まり、たとえば、好適に使用される逆相系カラムとの相互作用が格段に向上し、その結果、より鋭敏に糖鎖構造の差を反映して個々の糖鎖アスパラギン誘導体が分離されるようになったことによると考えられる。

- 5      さらに、先願によれば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体の保護基を除去することにより種々の糖鎖アスパラギンを、人工的に容易かつ大量に得ることができる。

上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖はいずれも  $\alpha$  2, 6 結合体のものであった。

- 10      また、上記先願で得られる糖鎖アスパラギン誘導体、糖鎖アスパラギン及び糖鎖はいずれもフコースが結合していない糖鎖アスパラギン誘導体であった。

ここで、 $\alpha$  2, 3 結合体と  $\alpha$  2, 6 結合体の相異について以下に説明する。

- 15       $\alpha$  2, 3 結合体、 $\alpha$  2, 6 結合体とは、シアル酸とガラクトースとの結合様式を表わすものである。前者は、シアル酸の 2 位の炭素と、ガラクトースの 3 位の炭素が  $\alpha$  結合しているものをいい、後者は、シアル酸の 2 位の炭素と、ガラクトースの 6 位の炭素が  $\alpha$  結合しているものをいう。これらは、ガラクトースとの結合炭素の違いではある。

- 20      本発明の方法においては先ず、出発化合物である脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギン（9 糖－A s n－F m o c）をシアル酸転移酵素を用いてシアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させ、得られた脂溶性の保護基で保護された糖鎖アスパラギンをクロマトグラフィーに供することにより分離し、脂溶性の保護基で保護されたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体および 2 種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体を得られる。

- 25      次に、得られたジシアロ糖鎖アスパラギン誘導体および 2 種のモノシアロ糖鎖アスパラギン誘導体を糖加水分解することにより、シアル酸あるいはシアル酸誘導体を有する 9 ～ 7 糖鎖アスパラギン誘導体を得られる。

また、上記で得られた 11～7 糖鎖アスパラギン誘導体やジシアロ糖鎖アスパ  
ラギン ( $\alpha$  2, 6-11 糖-Asn-Fmoc) を出発原料としそれを糖加水分解  
することにより得られる 10～6 糖鎖アスパラギン誘導体に、糖転移酵素により  
フコースを転移することによりフコースを含む 13～7 糖鎖アスパラギン誘導体  
5 が得られる。

当該保護基としては特に限定されるものではなく、例えば、Fmoc 基や t-  
ブチルオキシカルボニル (Boc) 基、ベンジル基、アリル基、アリルオキシカ  
ルボニル基、アセチル基等の、カーボネート系またはアミド系の保護基等を使用  
することができる。得られた糖鎖アスパラギン誘導体を直ちに所望の糖ペプチド  
10 の合成に使用できるという観点から、当該保護基としては、Fmoc 基または B  
oc 基などが好ましく、Fmoc 基がより好ましい。Fmoc 基はシアル酸等比  
較的酸性条件に不安定な糖が糖鎖に存在する場合に特に有効である。また、保護  
基の導入は公知の方法 (たとえば、Protecting groups in Organic chemistry, John  
Wiley & Sons INC., New York 1991, ISBN 0-471-62301-6を参照) に従って行え  
15 ばよい。

たとえば、Fmoc 基を用いる場合、糖鎖アスパラギンに対しアセトンを適量  
加えた後、さらに 9-フルオレニルメチル-N-スクシニミチルカーボネートと  
炭酸水素ナトリウムを加えて溶解し、25℃にてアスパラギン残基への Fmoc  
基の結合反応を行うことにより、当該糖鎖アスパラギンのアスパラギン残基に F  
20 moc 基を導入することができる。

以上の操作により、脂溶性の保護基が導入された糖鎖アスパラギン誘導体が得  
られる。

シアル酸としては、一般に市販されているシアル酸あるいは化学合成したもの  
を用いることができる。

25 シアル酸の誘導体としては、一般に市販されているシアル酸の誘導体あるいは  
化学合成したものをを用いることができる。具体的には、シアル酸の 7 位、8 位あ

るいは9位の炭素に結合している水酸基を水素原子あるいはハロゲン原子で置換したものを挙げるができる。ハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素等を挙げるができるが、好ましくはフッ素がよい。

シアル酸転移酵素としては、一般に市販されているもの、天然由来のもの、遺伝子組換えにより生産されたものを用いることができ、転移させるシアル酸あるいはシアル酸の誘導体の種類により適宜選択することができる。具体的には、 $\alpha$ 2,3転移酵素であるRat Recombinant由来のもの、 $\alpha$ 2,6転移酵素であるRat Liver由来のものを挙げるができる。また、シアリターゼをもちいてpH調整等により平衡をずらすことにより、シアル酸あるいはシアル酸の誘導体を転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組み合わせるにより行うことができる。

たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロピースカラムなどが利用可能である。分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

次に、上記で分離された糖鎖アスパラギン誘導体を加水分解することにより、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。たとえば、糖鎖アスパラギン誘導体を分離する段階においては混合物に含まれる糖鎖アスパラギン誘導体の種類を制限して糖鎖アスパラギン誘導体を大まかに分離し、次いで加水分解、たとえば、糖加水分解酵素を用いて加水分解することに

より所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を効率的に得ることができる。なお、加水分解は前記と同様にして行うことができる。特に、所望の糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体をより効率的に得る観点から、糖残基の切断様式が明確な糖加水分解酵素を用いて加水分解するのが好ましい。

- 5      たとえば、ガラクトース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってガラクトース加水分解酵素を用いてガラクトース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いるガラクトース加水分解酵素は
- 10    市販されている公知のエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であってもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカ
- 15    ラム、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18）で行うのが好ましい。

- N-アセチルグルコサミン残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってN-アセチルグルコサミン加水分解酵素を用いてN-アセチルグ
- 20    ルコサミン残基の切断反応を行うことにより成し得る。また、N-アセチルヘキサミンダーゼ加水分解酵素を用いてもよい。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であってもよい。この反応で用いる各酵素は市販されているエキソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であ
- 25    てもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖

アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール＝65：35または50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18）で行うのが好ましい。

5 マンノース残基の除去は、加水分解される化合物を緩衝液（たとえば、リン酸緩衝溶液、酢酸緩衝溶液、グッド緩衝溶液など）に溶かし、公知の条件に従ってマンノース加水分解酵素を用いてマンノース残基の切断反応を行うことにより成し得る。なお、加水分解される化合物は各々単離されたものであっても混合物であつてもよい。この反応で用いるマンノース加水分解酵素は市販されているエキ  
10 ソ型の酵素を利用するのが好ましい。また、同様の活性を有するものであれば、新たに単離された酵素、遺伝子工学的に創製された酵素であつてもよい。次いで、前記と同様にして、反応後に得られる反応液（糖残基が切断された糖鎖アスパラギン誘導体の混合物）をクロマトグラフィーに供し、各糖鎖アスパラギン誘導体を得ればよい。たとえば、分離はHPLC（ODSカラム、展開溶媒は、10～  
15 200 mM程度の酢酸アンモニウムなどの緩衝溶液とアセトニトリル、あるいはエタノール、あるいはメタノール、あるいはブタノール、あるいはプロパノールなどの脂溶性のある水溶性有機溶剤を適宜混ぜて用いることができる。ここに例示する場合、展開溶媒としては50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝82：18が好適である）で行うのが好ましい。

20 このようにして得られた各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、フコースを転移させることにより本発明の脂溶性の保護基でアスパラギンのアミノ基窒素が保護された糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む新規な糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

25 フコースとしては、一般に市販されているフコースあるいは化学合成したものを  
用いることができる。

フコース転移酵素としては、一般に市販されているもの、天然由来のもの、遺伝子組換えにより生産されたものを用いることができ、転移させるフコースの種類により適宜選択することができる。具体的には、糖鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンにフコースを転移させる酵素である

- 5 Fucosyltransferase V (Human, Recombinant、血漿由来、血清由来、乳汁由来、肝臓由来)などを挙げることができる。また、フコース加水分解酵素を用いてpH調整等により平衡ずらすことにより、フコースを転移させてもよい。

上記糖鎖アスパラギン誘導体のクロマトグラフィーによる分離は、適宜、公知のクロマトグラフィーを単独でまたは複数組合せて用いることにより行うことができる。

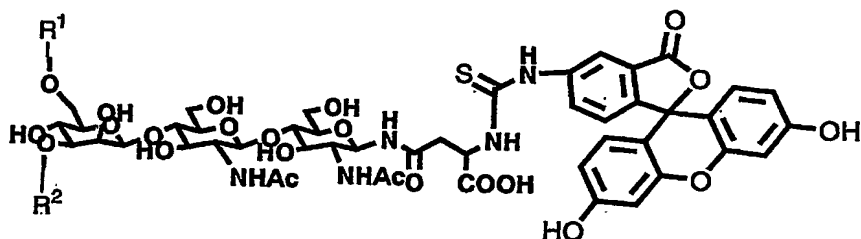
- たとえば、得られた糖鎖アスパラギン誘導体混合物をゲル濾過カラムクロマトグラフィーで精製後、HPLCを用いて精製する。HPLCにおいて用い得るカラムとしては逆相系のカラムが好適であり、たとえば、ODS、Phenyl系、ニトリル系や、陰イオン交換系のカラム、具体的には、たとえば、ファルマシア社製モノQカラム、イヤترون社製イアトロビーズカラムなどが利用可能である。
- 15 分離条件等は適宜、公知の条件を参照して調整すればよい。以上の操作により、糖鎖アスパラギン誘導体混合物から所望の各糖鎖アスパラギン誘導体を得ることができる。

- このように、各糖鎖アスパラギン誘導体を得た後、さらに各種糖加水分解酵素等を用いて当該誘導体を加水分解し、糖鎖の非還元末端の糖残基を除去することにより、たとえば、糖鎖の末端の分岐構造が不均一な様々な糖鎖アスパラギン誘導体をそれぞれ単一化合物として得ることができる。また、種々の糖加水分解酵素を用い、加水分解する順番やその種類を変えることで、より多くの種類の糖鎖アスパラギン誘導体を製造することができる。

- 25 従来の方法によれば、極限られた糖鎖構造を有する糖鎖アスパラギン誘導体を分析スケールで得るのにさえ膨大な時間とコストが必要であったが、本発明によ







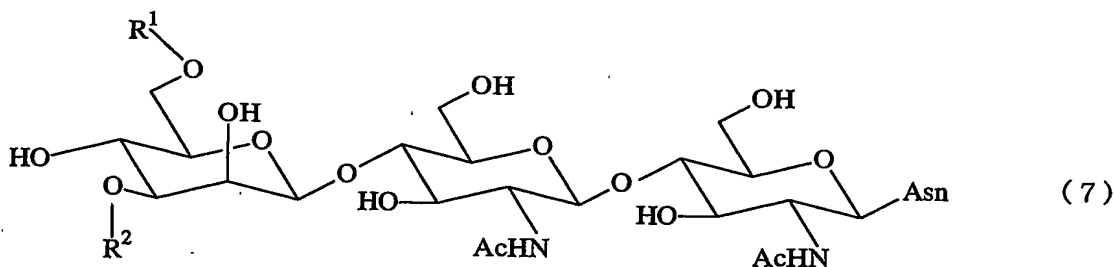
(9)

[式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記と同じである。]

また、本発明は、糖鎖アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化又はF I T C化したビオチン化又はF I T C化糖鎖アスパラギンの製造方法である。

- 5 本発明のビオチン化又はF I T C化糖鎖アスパラギンの製造方法としては、例えば、上記に示した種々の単離された糖鎖アスパラギンのアスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化又はF I T C化することにより得ることができる。

本発明で使用される糖鎖アスパラギンとしては、例えば、式(7)で表される化合物を挙げることができる。



- 10 (式中、 $R^1$ および $R^2$ は上記に同じ。)

具体的な糖鎖アスパラギンとしては、先願に記載された化合物を挙げることができる。即ち、先願の第3～4図に示された $\alpha 2, 6$ 化合物を同様に用いることができ、記号化したこれら化合物を本発明の表1～3に示す。

- 15 また上記糖鎖アスパラギンを合成するために用いられた糖鎖アスパラギン誘導体としても、先願に記載された $\alpha 2, 6$ 化合物を挙げることができる。即ち、先願の第1～2図に示された化合物を同様に用いることができ、記号化したこれら化合物を本発明の表4～6に示す。

また上記先願に記載された糖鎖アスパラギン以外に、 $\alpha 2, 3$  結合体の糖鎖アスパラギン、並びに ( $\alpha 2, 3$ ) ( $\alpha 2, 6$ ) 結合体の糖鎖アスパラギン、更にはこれらのフコース結合体の糖鎖アスパラギンを用いることができる。

5 本発明のビオチン化としては、公知の方法に従って行うことができる。例えば、糖鎖アスパラギンを水に溶かし重炭酸ナトリウムを加え、ここに、D- (+) -ビオチニルスクシンイミドを溶かしたジメチルホルムアミドを加え、室温で20分反応させ、ゲルろ過カラム等で精製し、ビオチン化糖鎖アスパラギンを得ることができる。

10 本発明のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたマイクロプレートは、市販のアビジン化したマイクロプレート（例えば、ピアス社製）に、ビオチン化した糖鎖アスパラギンを反応させることにより製造することができる。

また、本発明のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させたアフィニティーカラムは、市販のアビジン化したアフィニティーカラムに、ビオチン化した糖鎖アスパラギンを反応させることにより製造することができる。

15 本発明のFITC化としては、公知の方法に従って行うことができる。例えば、糖鎖アスパラギンを水に溶かし、アセトン、重炭酸ナトリウムを加え、ここに、フルオレセインイソチオシアネートを加え、室温で2時間反応させ、ゲルろ過カラム等で精製し、FITC化糖鎖アスパラギンを得ることができる。

20 本発明で得られたFITC化糖鎖アスパラギンは、例えば生体組織中の糖類の受容体の研究、レクチンの糖結合特異性の研究に有用である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例を挙げて説明するが、本発明は何らこれら実施例に限定されるものではない。なお、 $^1\text{H}$ -NMRのデータは、実施例1～7及び参考例45については30℃でHODを4.8 ppmとして、参考例1～44については30℃  
5 で内部標準としてアセトンのメチル基のシグナルを2.225 ppm、HODを4.718 ppmとして測定して得られた値である。また、Fmoc基が除去された化合物については測定溶媒中に50 mMの炭酸水素アンモニウムを共存させて測定した。

参考例1 ジシアロ糖鎖アスパラギン（化合物24）の合成

10 卵由来粗精製SGP（シアリルグリコペプチド）2.6 gをトリスー塩酸・塩化カルシウム緩衝溶液（TRIZMA BASE 0.05 mol/l、塩化カルシウム0.01 mol/l、pH 7.5）100 mlに溶解させた。これにアジ化ナトリウム58 mg（772  $\mu\text{mol}$ ）とアクチナーゼ-E（科研製薬社製）526 mgを加え、37℃で静置した。65時間後、再びアクチナーゼ-Eを2  
15 63 mg加え、更に37℃で24時間静置した。この溶液を凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25、2.5  $\phi$  × 1 m、展開溶媒は水、流速は1.0 ml/min）で2回精製し、化合物24を1.3 g（555  $\mu\text{mol}$ ）得た。

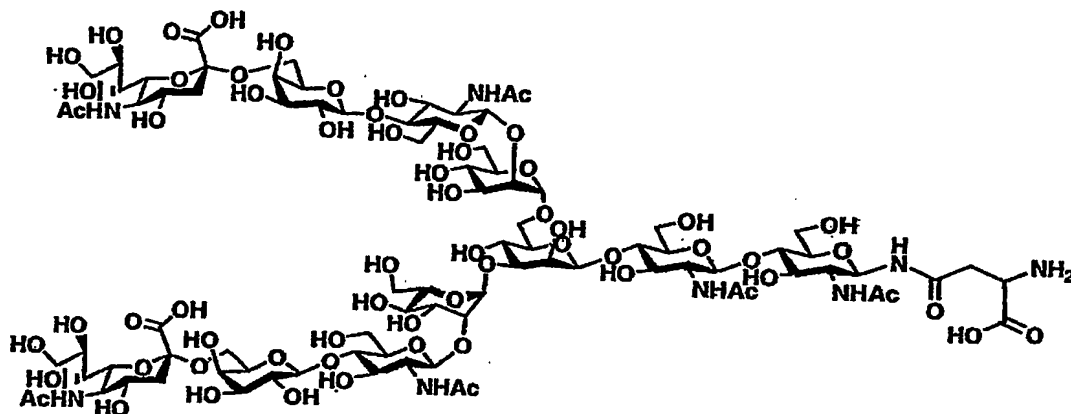
得られた化合物24の物理的データは以下の通りである。

20  $^1\text{H}$ -NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30℃)

5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.67 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,6'-H1),  
25 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, dd, Asn- $\beta$

CH),

3.00 (1H, dd, Asn-βCH), 2.76 (2H, dd, NeuAc 7, 7'-H3eq), 2.15 (18H, s×6, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc 7, 7'-H3ax)



5

#### 参考例2 化合物1、2、6および10の合成

参考例1で得られた化合物24 (609mg, 261 μmol) を水20.7 mlに溶解させ、さらに0.1規定塩酸13.8mlを加えた。この溶液を70℃  
 10 で35分間加熱した後速やかに氷冷し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加えpH7とした。これを凍結乾燥した後、残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5φ×1m、展開溶媒は水、流速は1.0 ml/min・) で精製したところ、化合物24、化合物25および29、化合物33の混合物534mgを得た。この4成分はそれぞれを単離することなく次  
 15 の工程に進めた。

なお、得られた糖鎖混合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

5.13 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H1), 5.01 (d, GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s,  
 20 Man4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNA

c 2-H1), 4.58 (d, GlcNAc 5, 5' -H1), 4.47 (dd, Gal 6, 6' -H1), 4.44 (d, Gal 6, 6' -H1), 4.24 (d, Man 3-H2), 4.19 (d, Man 4' -H2), 4.11 (d, Man 4-H2), 2.97 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.72 (dd, NeuAc 7-H3 eq, NeuAc 7-H3 eq), 2.64 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc 7-H3 ax, NeuAc 7' -H3 ax)

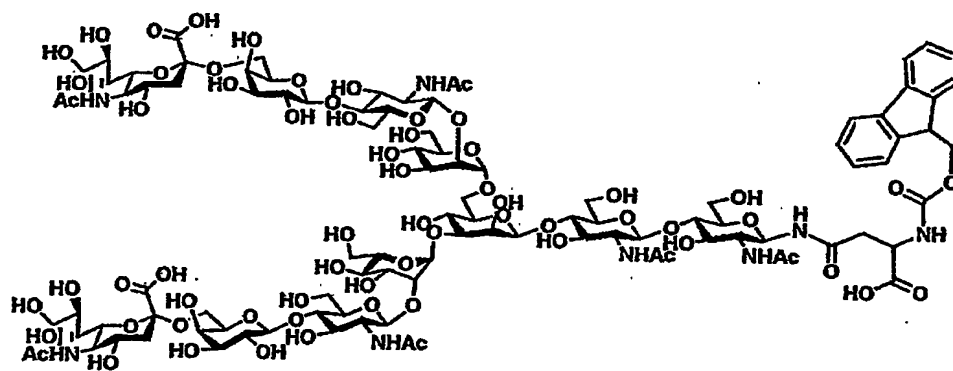
得られた糖鎖の混合物 429mg をアセトン 16.3ml と水 11.2ml に溶解させた。ここに 9-フルオレニルメチル-N-スクシニミチルカーボネート (155.7mg, 461.7  $\mu$ mol) と炭酸水素ナトリウム (80.4mg, 957  $\mu$ mol) を加え、室温で 2 時間攪拌した。この溶液をエバポレーターに供してアセトンを除き、残りの溶液をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5  $\phi$   $\times$  1m, 展開溶媒は水、流速は 1.0ml/min) で精製したところ、化合物 1、化合物 2 および 6、化合物 10 の混合物 309mg が得られた。この混合物を HPLC (ODS カラム、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : メタノール = 65 : 35, 2.0  $\phi$   $\times$  25 cm, 流速 3ml/min) を用いて精製したところ、51 分後に化合物 1 が、67 分後に化合物 2 および 6 の混合物が、93 分後に化合物 10 が溶出した。それぞれを取り分け凍結乾燥を行った後、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25, 2.5  $\phi$   $\times$  30 cm, 展開溶媒は水、流速は 1.0ml/min) で脱塩することで目的の化合物 2 および 6 の混合物 150mg を得た。

なお、得られた化合物 1 の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30 $^\circ\text{C}$ )

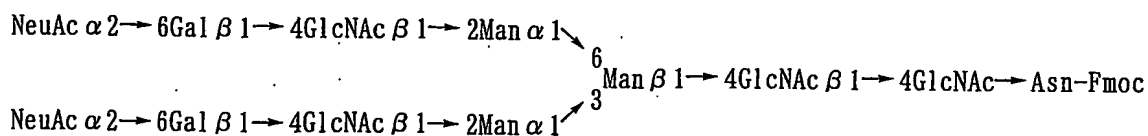
7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4 H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man 4-H1), 5.06 (1H, d, GlcNAc 1-H1), 4.95 (1H, s, Man 4' -H1), 4.82 (1

H, s, Man 3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc 2-H1),  
 4.67 (2H, d, GlcNAc 5, 5' -H1), 4.53 (2H, d, Gal  
 6, 6' -H1), 4.34 (1H, d, Man 3-H2), 4.27 (1H, d,  
 Man 4' -H2), 4.19 (1H, d, Man 4-H2), 3.03 (1H,  
 5 bdd, Asn-βCH), 3.00 (1H, bdd, Asn-βCH), 2.76  
 (2H, dd, NeuAc 7, 7' -H3eq), 2.15 (18H, s×6, -  
 Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc 7, 7' -H3ax); HRMS Ca  
 lcd for C<sub>103</sub>H<sub>154</sub>N<sub>8</sub>NaO<sub>66</sub> [M+Na+] 2581.8838,  
 found, 2581.8821



上記の糖鎖の構造を記号化すると次のようになる。ここで

NeuAc : シアル酸      Gal : D-ガラクトース      GlcNAc : N-ア  
 セチルグルコサミン      Man : D-マンノース      Asn : アスパラギン  
 15 を示す。



また、得られた化合物 2 および 6 の混合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (d, Fmoc), 7.79 (d, Fmoc), 7.55 (m, Fmoc),  
5.14 (s, Man4-H1), 5.12 (s, Man4-H), 5.00 (d,  
GlcNAc1-H1), 4.94 (s, Man4'-H1), 4.93 (s, Ma  
5 n4'-H1), 4.82 (s, Man3-H1), 4.60 (d, GlcNAc2  
-H1), 4.58 (d, GlcNAc5,5'-H1), 4.46 (dd, Gal  
6,6'-H1), 4.44 (d, Gal6,6'-H1), 4.24 (d, Man3  
-H2), 4.19 (d, Man4'-H2), 4.11 (d, Man4-H2),  
2.97 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.72 (dd, NeuAc7-H3eq,  
10 NeuAc7-H3eq), 2.64 (bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (s $\times$   
5, -Ac), 1.79 (dd, NeuAc7-H3ax, NeuAc7'-H3  
ax)

また、得られた化合物10の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

15 7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4  
H, m, Fmoc), 5.12 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,  
GlcNAc1-H1), 4.93 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1  
H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6  
7 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,  
20 6'-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Ma  
n4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 3.03 (1H, bdd,  
Asn- $\beta$ CH), 3.00 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (12H,  
s $\times$ 4, -Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{81}\text{H}_{120}\text{N}_6\text{NaO}_{50}$   
[M+Na+] 1999.6930, found, 1999.6939

## 25 参考例3 化合物3および7の合成

参考例2で得られた化合物2および6の混合物 (224mg,  $97\mu\text{mol}$ )

とウシ血清アルブミン24mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH6.0)22mlに溶解させ、さらに*Diplococcus pneumoniae*由来β-ガラクトシダーゼ(1.35U)を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、凍結乾燥を行った。残留物をHPLC(ODSカラム、2.0φ×25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=85：15、流速3ml/min)で精製したところ、129分後に化合物3が、134分後に化合物7が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC〔ODSカラム、2.0φ×25cm、展開溶媒は最初の15分間水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル(容量比)=10：0から85：15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル=85：15から80：20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min〕を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物3が81mg、化合物7が75mg得られた。

なお、得られた化合物 3 の物理的データは以下の通りである。

15  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4  
H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,  
GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1  
H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6  
20 7 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6'  
-H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man  
4'-H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd,  
Asn-βCH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7'-H3eq), 2.61  
(1H, bdd, Asn-βCH), 2.15 (1.5H, s×5, -Ac), 1.7  
25 9 (1H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for  
C<sub>86</sub>H<sub>127</sub>N<sub>7</sub>NaO<sub>53</sub> [M+Na+] 2128.7356, found, 21



2 8 . 7 3 6 3

また、得られた化合物7の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ )

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4  
5 H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,  
GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1  
H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6  
7 (2H, d, GlcNAc5, 5'-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-  
H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4'  
10 -H2), 4.19 (1H, d, Man4-H2), 2.97 (1H, bdd, As  
n- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.60 (1H,  
bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (15H, s $\times$ 5, -Ac), 1.79 (1H,  
dd, NeuAc7-H3ax); HRMS Calcd for  $\text{C}_{86}\text{H}_{125}$   
 $\text{N}_7\text{Na}_3\text{O}_{53}$  [M+Na+] 2172.6995, found, 2172.70  
15 84

#### 参考例4 化合物4および8の合成

参考例3で得られた化合物3および7の混合物 (90mg,  $47.3\mu\text{mol}$ ) をそれぞれ分離することなく、ウシ血清アルブミン8mgと共にHEPES  
緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 8.1mlに溶解させ、さらにBovine  
20 kidney由来 $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from  
Bovine kidney) を2.88U加えた。この溶液を $37^\circ\text{C}$ で18時  
間静置した後凍結乾燥し、残留物をHPLC (ODSカラム、 $2.0\phi\times 25\text{cm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：メタノール=65：35、流  
速 $3\text{ml}/\text{min}$ ) で精製したところ、117分後に化合物4が、127分後に  
25 化合物8が溶出した。それぞれを取り分け、凍結乾燥を行った。続いてHPLC  
(ODSカラム、 $2.0\phi\times 25\text{cm}$ 、展開溶媒は最初の15分間が水、16分

後から30分後までは水：アセトニトリル＝10：0から85：15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル＝85：15から80：20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0 ml/min・)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物4が40 mg、化合物8が37 mg得られた。

5    なお、得られた化合物4の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4  
H, m, Fmoc), 5.22 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d,  
GlcNAc1-H1), 4.94 (1H, s, Man4'-H1), 4.84  
10 (1H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1),  
4.67 (1H, d, GlcNAc5-H1), 4.55 (1H, d, Gal6-  
H1), 4.33 (1H, dd, Man3-H2), 4.20 (1H, dd, Man  
4-H2), 4.15 (1H, dd, Man4'-H2), 2.97 (1H, bdd,  
Asn- $\beta$ CH), 2.76 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3eq),  
15 2.62 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -A  
c), 1.79 (2H, dd, NeuAc7,7'-H3ax); HRMS Cal  
cd  
for  $\text{C}_{78}\text{H}_{114}\text{N}_6\text{NaO}_{48}$  [M+Na+] 1925.6562, found,  
1925.6539

20    また、得られた化合物8の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C)

7.99 (2H, d, Fmoc), 7.79 (2H, d, Fmoc), 7.55 (4  
H, m, Fmoc), 5.15 (1H, s, Man4-H1), 5.06 (1H, d,  
GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4'-H1), 4.82 (1  
25 H, s, Man3-H1), 4.69 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.6  
7 (2H, d, GlcNAc5,5'-H1), 4.53 (2H, d, Gal6,

6' -H1), 4.34 (1H, d, Man3-H2), 4.27 (1H, d, Man4' -H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH<sub>2</sub>), 2.76 (1H, ddd, NeuAc7' -H3eq), 2.61 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH<sub>2</sub>), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (1H, dd, NeuAc7' -H3ax); HRMS Calcd for C<sub>78</sub>H<sub>114</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>48</sub> [M+Na<sup>+</sup>] 1925.6562, found, 1925.6533

#### 参考例5 化合物5の合成

参考例4で得られた化合物4 (30mg, 473  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン3mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 6mlに溶解させ、  
 10 さらにJack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを10U加えた。この溶液を37℃で21時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLC (ODSカラム、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水：アセトニトリル=10：0から85：15、31分後から45分後までは水：アセトニトリル=85：15から80：20になるようにグラジエントを  
 15 掛けた。流速は3.0ml/min) を用いて精製したところ、目的とする化合物5が20mg得られた。

なお、得られた化合物5の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4  
 20 H, m, Fmoc), 5.00 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.95 (1H, s, Man4' -H1), 4.84 (1H, s, Man3-H1), 4.67 (1H, d, GlcNAc2-H1), 4.56 (1H, d, GlcNAc5-H1),  
 4.44 (1H, d, Gal6-H1), 4.11 (1H, dd, Man4' -H  
 25 2), 4.07 (1H, dd, Man3-H2), 2.97 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, ddd, NeuAc7' -H3eq), 2.62 (1H,

bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.15 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.79 (2H, dd, NeuAc7'-H3ax); HRMS Calcd for C<sub>72</sub>H<sub>104</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>43</sub> [M+Na+] 1763.6034, found, 1763.6074

#### 5 参考例6 化合物9の合成

参考例4で得られた化合物8 (40mg, 630 $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン5gをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH6.0) 7.8mlに溶解させ、Jack Beans由来 $\alpha$ -マンノシダーゼを38U加えた。この溶液を37℃で63時間静置した後凍結乾燥し、続いてHPLCC (ODSカラム、

10 2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は最初の15分間が水、16分後から30分後までは水:アセトニトリル=10:0から85:15、31分後から45分後までは85:15から80:20になるようにグラジエントを掛けた。流速は3.0ml/min)を用いて精製したところ、目的とする化合物9が30mg得られた。

15 なお、得られた化合物9の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (D<sub>2</sub>O, 30℃)

8.01 (2H, d, Fmoc), 7.80 (2H, d, Fmoc), 7.56 (4H, m, Fmoc), 5.23 (1H, s, Man4-H1), 5.08 (1H, d, GlcNAc1-H1), 4.53 (1H, d, Gal6-H1), 4.32 (1H, 20 ddd, Man3-H2), 4.28 (1H, dd, Man4-H2), 2.81 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (1H, dd, NeuAc7-H3eq), 2.59 (1H, bdd, Asn- $\beta$ CH), 2.13 (12H, s $\times$ 4, -Ac), 1.80 (1H, dd, NeuAc7H3ax); HRMS Calcd for C<sub>72</sub>H<sub>104</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>43</sub> [M+Na+] 1763.6034, found, 25 d, 1763.6041

参考例7 Fmoc基の脱保護 (化合物33の合成)

参考例2で得られた化合物10 (10.5mg, 5.27  $\mu$ mol) を50%モルホリン/N,N-ジメチルホルムアミド溶液1.4mlに溶解させ、室温・アルゴン雰囲気下で2時間反応させた。この溶液にトルエン3mlを加え、35℃でエバポレーターに供した。この操作を三回繰り返し、反応溶媒を取り除いた。残留物をゲル濾過カラムクロマトグラフィー (Sephadex G-25、2.5  $\phi$   $\times$  30cm、展開溶媒は水、流速は1.0ml/min) で精製したところ、目的とする化合物33が7mg得られた (収率は76%)。なお、得られた化合物の構造は、参考例2から得られる化合物33と<sup>1</sup>H-NMRスペクトルが一致したことから確認した。

10 化合物33の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 1H, J=8.0Hz, GlcNAc2-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.8Hz, GlcNAc5,5'-H-1), 4.47 (d, 2H, J=7.9Hz, Gal6,6'-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.19 (bdd, 1H, J=3.2Hz, 1.4Hz, Man4'-H-2), 4.12 (bdd, 1H, J=3.2Hz, 1.4Hz, Man4-H-2), 2.93 (dd, 1H, J=4.5Hz, 17.0Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.93 (dd, 1H, J=6.8Hz, 17.0Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac  $\times$  2), 2.01 (s, 3H, Ac)

参考例8 化合物14の合成

化合物3 (28mg, 21.3  $\mu$ mol) とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 454  $\mu$ L) に溶解させ、ノイラミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholera

e, 198mU)を加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物14(17mg, 収率70%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

10.

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=8.0Hz, GlcNAc 2-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.4Hz, GlcNAc 5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal 6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bd, 1H, J=1.9Hz, Man 3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.4Hz, 3.3Hz, Man 4-H-2), 4.11 (bdd, 1H, J=1.4Hz, 3.5Hz, Man 4'-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.0Hz, 15.7Hz, Asn-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.7Hz, 15.7Hz, Asn-βCH), 2.06, 2.05, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for C<sub>75</sub>H<sub>110</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>45</sub> [M+Na+] 1837.6402, found 18

37.6471

## 参考例9 化合物19の合成

化合物7 (20mg, 9.4  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 323  $\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミニ  
5 ダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 141mU) を加えた。この溶液を37℃で18時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いてHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル  
10 =80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物19 (13mg, 収率76%) を得た。得られた化合物の構造は<sup>1</sup>H-NMRが標品と一致したことから確認した。

## 15 参考例10 化合物15の合成

化合物4 (45mg, 24  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 820  $\mu\text{L}$ ) に溶解させ、ノイラミ  
ニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 134mU) を加えた。この溶液を37℃で14時間静置した後、HPLC  
20 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>O  
25 を50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物15 (28mg, 収率74%) が得られた。得られた化

化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  7.92 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.71 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc),  
5 7.44 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1),  
4.92 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.58 (d, 2H, GlcNAc 2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , Gal 6'-H-1), 4.35 (t, 1H, Fmoc),  
10 4.24 (bd, 1H,  $J=1.9\text{ Hz}$ , Man 3-H-2), 4.11 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=8.7\text{ Hz}$ ,  $15.5\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.06, 2.04, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for  $\text{C}_{67}\text{H}_{97}\text{N}_5\text{NaO}_{40}$  [M+Na+ 1634.5608, found, 1634.5564

#### 参考例 11 化合物 70 の合成

化合物 15 (11mg,  $6.8\text{ }\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 1.5mg を HEPES 緩衝溶液 (50mM, pH 5.0,  $269\text{ }\mu\text{L}$ ) に溶解させ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans,  $11\text{ }\mu\text{L}$ ,  $275\text{ mU}$ ) を加えた。この溶液を  $37^\circ\text{C}$  で 14 時間静置した後、HPLC 分析により反応終了を確認した。反応溶液を HPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178,  $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は 50mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 80 : 20、流速  $4\text{ mL/min}$ ) で精製した。更に ODS カラム (コスモシール 75C18-OPN,  $15\times 100\text{ mm}$ 、最初に  $\text{H}_2\text{O}$  を 50mL 流し、



次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物70(6.3mg, 収率64%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

5  $\delta$  7.91 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.70 (d, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.50 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 7.43 (dd, 2H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc 2,5'-H-1), 4.32 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man 4-H-2), 4.06 (bs, 1H,  $J=1.3\text{ Hz}$ , Man 4'-H-2), 2.72 (bd, 1H,  $J=14.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{ CH}$ ), 2.52 (bdd, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ ,  $14.8\text{ Hz}$ , Asn- $\beta\text{ CH}$ ), 2.06, 15 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{61}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{35}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1450.5, found, 1450.4

#### 参考例12 化合物20の合成

化合物8(47mg,  $25\text{ }\mu\text{mol}$ )とウシ血清アルブミン1.9mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0,  $840\text{ }\mu\text{L}$ )に溶解させ、ノイラミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from *Vibrio Cholerae*, 369mU)を加えた。この溶液を37°Cで37時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS N 20 2020178、 $20\times 250\text{ mm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速 $4\text{ mL/min}$ )で精製した。更に

ODSカラム (コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物20 (26mg, 収率65%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

5 <sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.4Hz, GlcNAc 1-H-1), 10 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.57 (bd, 2H, GlcNAc 2,5'-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.5Hz, Gal 6'-H-1), 4.34 (t, 3H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.19 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, Asn-βCH), 2.5 15 2 (bdd, 1H, J=9.2Hz, 15.5Hz, Asn-βCH), 2.06, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); HRMS Calcd for C<sub>67</sub>H<sub>97</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>40</sub> [M+Na+] 1634.5608, found, 1634.5644

参考例13 化合物71の合成

20 化合物20 (12mg, 7.4 μmol) とウシ血清アルブミン1.0mgをHEPES緩衝溶液 (50mM, pH5.0, 330 μL) に溶解させ、β-ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 12 μL, 297mU) を加えた。この溶液を37℃で46時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178, 20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリ

25

ル＝80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモ  
シール75C18-OPN、15×100mm。最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、  
次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする  
化合物71(6.6mg, 収率61%)が得られた。得られた化合物の物理的デ  
5 ータは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.90 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=  
7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc),  
7.42 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man  
10 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.4 Hz, GlcNAc 1-H-1),  
4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-  
1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.31 (b, 1H,  
Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.18 (bs, 1H,  
Man 4-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.8 Hz, 3.3 Hz, Man  
15 4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-βCH),  
2.52 (bdd, 1H, J=8.0 Hz, 15.5 Hz, Asn-ββCH),  
2.06, 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac); MS (F  
ab), Calcd for C<sub>61</sub>H<sub>88</sub>N<sub>5</sub>O<sub>35</sub> [M+H+] 1450.5,  
found, 1450.3

#### 20 参考例14 化合物16の合成

化合物5(32mg, 18.4 μmol)とウシ血清アルブミン2.5mgをH  
EPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 713 μL)に溶解させ、ノイラミ  
ニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholera  
e, 134mU)を加えた。この溶液を37℃で17時間静置した後、HPLC  
25 分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC(YMC Pac  
ked Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2

020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=80：20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシル75C18-OPN、15×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物16(13mg、収率52%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.44 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.9Hz, GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 2H, J=7.5Hz, GlcNAc2,5'-H-1), 4.47 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal6'-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.10 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.07 (bs, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, Asn-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.2Hz, 15.5Hz, Asn-βCH), 2.07, 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>61</sub>H<sub>88</sub>N<sub>5</sub>O<sub>35</sub> [M+H+] 1450.5, found, 1450.3

#### 20 参考例15 化合物17の合成

化合物16(9mg, 6.2μmol)とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 613μL)に溶解させ、β-ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、from Jack Beans, 18.6mU)を加えた。この溶液を37℃で32時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×25

0 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速4 mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシル75 C18-OPN、15×100 mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50 mL流し、次に25% アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物17  
5 (5.4 mg, 収率68%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

δ 7.89 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc),  
10 7.42 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.55 (d, 1H, J=8.1 Hz, GlcNAc2,5'-H-1), 4.09, 4.07 (s, 1H, Man4'-H-2, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-βCH), 2.56 (bdd, 1H, J=8.1 Hz, 15.5 Hz, Asn-βCH), 2.07, 2.05, 1.89  
15 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>55</sub>H<sub>77</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>30</sub> [M+Na+] 1310.5, found, 1310.2

#### 参考例16 化合物18の合成

化合物17 (3.4 mg, 2.6 μmol) とウシ血清アルブミン1.1 mgを  
20 HEPES緩衝溶液 (50 mM, pH5.0, 257 μL) に溶解させ、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ from Jack Beans, 144 mU), 加えた。この溶液を37°Cで24時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.  
25 2020178, 20×250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速4 mL/min) で精製した。更にOD

Sカラム（コスモシル75C18-OPN、15×100mm。最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた）で脱塩したところ、目的とする化合物18（2.1mg，収率75%）が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

5 <sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5Hz, 7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, 7.5Hz, Fmoc), 5.00 (d, 1H, J=9.7Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (d, 1H, J=1.6Hz, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.58 (d, 1H, J=7.8Hz, GlcNAc2-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.07 (d, 1H, J=2.7Hz, Man4'-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.6Hz, 3.7Hz, Man3-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=3.2Hz, 15.1Hz, Asn-βCH), 15 2.52 (bdd, 1H, J=8.9Hz, 15.1Hz, Asn-βCH), 2.07, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>47</sub>H<sub>65</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub> [M+Na+] 1085.4, found, 1085.3

参考例17 化合物21の合成

20 化合物9（28mg，16μmol）とウシ血清アルブミン1.7mgをHEPES緩衝溶液（50mM，pH5.0，624μL）に溶解させ、ノイラミニダーゼ（シグマアルドリッチ社製、from Vibrio Cholerae, 117mU）を加えた。この溶液を37℃で17時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。続いて、反応溶液をHPLC（YMC Packe  
25 d Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：ア

セトニトリル=80:20、流速4mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシル75C18-OPN、15×100mm。最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、  
5 目的とする化合物21(14.6mg, 収率68%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc),  
7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man  
10 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.5Hz, GlcNAc1-H-1),  
4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (d, 2H, J=7.2Hz, GlcNAc2-H-1), 4.46 (d, 1H, J=7.8Hz, Gal6-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (bd, 1H, J=2.7Hz, Man3-H-2), 4.19 (b, 1H, Man4-H-2), 2.72 (bdd,  
15 1H, J=15.5Hz, Asn-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=9.8Hz, 15.5Hz, Asn-βCH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.89 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for C<sub>61</sub>H<sub>88</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>  
5 [M+H+] 1450.5, found, 1450.3

#### 参考例18 化合物22の合成

20 化合物21(10mg, 6.9μmol)とウシ血清アルブミン1.6mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 672μL)に溶解させ、β-ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、from Jack Beans, 205mU)を加えた。この溶液を37℃で20時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column  
25 D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、20×250mm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=8

0 : 20、流速4 mL/min) で精製した。更にODSカラム (コスモシール  
75C18-OPN、15×100 mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50 mL流し、次に2  
5%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物  
22 (5.6 mg, 収率64%) が得られた。得られた化合物の物理的データは  
5 以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

δ 7.87 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.67 (d, 2H, J=  
7.5 Hz, Fmoc), 7.48 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc),  
7.41 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.12 (s, 1H, Man  
10 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc 1-H-1),  
4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.55 (d, 2H, J=8.6 Hz,  
GlcNAc 2, 5-H-1), 4.26 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d,  
1H, J=2.2 Hz, Man 3-H-2), 4.18 (bdd, 1H, J=1.3  
Hz, 3.3 Hz, Man 4-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz,  
15 Asn-βCH), 2.54 (bdd, 1H, J=9.5 Hz, 15.5 Hz, As  
n-βCH), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac); M  
S (Fab), Calcd for C<sub>55</sub>H<sub>78</sub>N<sub>5</sub>O<sub>30</sub> [M+H+] 1288.  
5, found, 1288.3

#### 参考例19 化合物23の合成

20 化合物22 (3.6 mg, 2.8 μmol) とウシ血清アルブミン1.2 mgを  
HEPES緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0, 277 μL) に溶解させ、N-ア  
セチル-β-D-グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ from Jac  
k Beans, 195 mU) を加えた。この溶液を37°Cで24時間静置した  
後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC (YMC P  
25 acked Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.  
2020178, 20×250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶



液：アセトニトリル＝８０：２０、流速４ｍＬ／ｍｉｎ）で精製した。更にＯＤ  
Ｓカラム（コスモシール７５Ｃ１８－ＯＰＮ、１５×１００ｍｍ、最初にＨ<sub>２</sub>Ｏ  
を５０ｍＬ流し、次に２５％アセトニトリルを流して溶出させた）で脱塩したと  
ころ、目的とする化合物２３（２．３ｍｇ、収率７７％）が得られた。得られた

5 化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR（３０℃）

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc),  
7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man  
10 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc 1-H-1),  
4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.57 (d, 1H, J=6.5 Hz, GlcNAc-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.22 (d, 1H, J=3.0 Hz, Man 3-H-2), 4.07 (bdd, 1H, J=2.1 Hz, Man 4-H-2), 2.72 (bdd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-βCH),  
15 2.52 (bdd, 1H, J=8.9 Hz, 15.5 Hz, Asn-βCH),  
2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab),  
Calcd for C<sub>47</sub>H<sub>65</sub>N<sub>4</sub>O<sub>25</sub> [M+H+] 1085.4, found, 1085.3

#### 参考例 20 化合物 11 の合成

20 化合物 10（１２３ｍｇ、６２μｍｏｌ）とウシ血清アルブミン（１．１ｍ  
ｇ）をＨＥＰＥＳ緩衝溶液（５０ｍＭ、ｐＨ５．０、２．５ｍＬ）に溶解させ、β  
ーガラクトシダーゼ（生化学工業社製、from Jack Beans, 24  
μL, 612mU）を加えた。この溶液を３７℃で６１時間静置した後、ＨＰＬ  
Ｃ分析により反応終了を確認した。反応溶液を凍結乾燥し、続いてＨＰＬＣ（Ｙ  
25 MC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A OD  
S No. 2020178、２０×２５０ｍｍ、展開溶媒は５０ｍＭ酢酸アンモ

ニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速3.5mL/min)で精製した。更にODSカラム(コスモシル75C18-OPN、15×100mm。最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物11(71mg, 収率70%)が得られた。

5 得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.11 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (1H, d, J=9.9Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.55 (d, 2H, J=8.6Hz, GlcNAc2, 5-H-1), 4.34 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (s, 1H, Man4-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, Asn-βCH), 2.51 (bdd, 1H, J=9.0Hz, 15.5Hz, Asn-βCH), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac×2), 1.88 (s, 3H, Ac); H RMS Calcd for C<sub>69</sub>H<sub>100</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>40</sub> [M+Na+] 1675.5873, found, 1675.5841

## 20 参考例21 化合物12の合成

化合物11(50mg, 30μmol)とウシ血清アルブミン2.0mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 920μL)に溶解させ、N-アセチル-β-D-グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製, from Jack Beans, 2.1U)を加えた。この溶液を37℃で48時間静置した後、HPLC分析により反応終了を確認した。反応溶液をHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.

2020178、20×250mm、展開溶媒は5.0mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速4mL/min)で精製し、凍結乾燥を行った。この残留物をODSカラム(コスモシル75C18-OPN、1.5×100mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50mL流し、次に25%アセトニトリルを流して  
5 溶出させた)で脱塩したところ、目的とする化合物12(25mg、収率66%)が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.91 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 7.50 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc),  
10 7.43 (dd, 2H, J=7.5Hz, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 4.99 (d, 1H, J=9.7Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.91 (bd, 1H, J=1.6Hz, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.58~4.52 (b, 1H, GlcNAc 2-H-1), 4.33 (t, 1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man 3-H-1),  
15 2), 4.06 (dd, 1H, J=1.6Hz, 3.2Hz, Man 4-H-2), 3.97 (dd, 1H, J=1.6Hz, 3.5Hz, Man 4'-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5Hz, Asn-βCH), 2.53 (bdd, 1H, J=9.0Hz, 15.5Hz, Asn-βCH), 2.05, 1.88 (each s, each 3H, Ac),

20 参考例22 化合物13の合成

化合物12(10mg, 11μmol)とウシ血清アルブミン0.9mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0, 440μL)に溶解させ、α-マンノシダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans, 30μL, 3.2U)を加えた。この溶液を37℃で21時間静置した後、HPLC  
25 分析により反応終了を確認した。続いてHPLC(YMC Packed Column D-ODS-5 S-5 120A ODS No.2020178、

20×250 mm、展開溶媒は50 mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル＝80：20、流速4 mL/min) で精製を行った。更にODSカラム (コスモシール75C18-OPN、15×100 mm、最初にH<sub>2</sub>Oを50 mL流し、次に25%アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したところ、目的とする化合物13 (3 mg, 収率4.3%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 7.92 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.71 (d, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 7.51 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc),  
10 7.43 (dd, 2H, J=7.5 Hz, Fmoc), 4.99 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.57 (1H, GlcNAc2-H-1), 4.06 (d, 1H, J=3.2 Hz, Man3-H-2), 2.72 (bd, 1H, J=15.5 Hz, Asn-βCH), 2.52 (bdd, 1H, J=8.3 Hz, 15.5 Hz, Asn-βCH),  
15 2.05, 1.89 (each s, each 3H, Ac),

(糖鎖アスパラギン誘導体のFmoc基の脱保護)

全ての糖鎖アスパラギン誘導体において、以下の手順でFmoc基の脱保護を行った。まず、糖鎖アスパラギンFmoc体1 μmolあたりに240 μLのN,N-ジメチルホルムアミド、160 μLのモルホリンを加え、室温・アルゴン雰囲気下で反応させた。TLC (展開溶媒として1 M 酢酸アンモニウム：イソプロパノール＝8：5を用いた) にて反応終了を確認した後、氷水で冷却した。ここにジエチルエーテルを反応溶液の10倍量加えて15分間攪拌した後、析出した沈殿物をろ別した。得られた残渣を水に溶解させ、35℃でエバポレートした。更にトルエンを3 mL加えエバポレートするという操作を三回繰り返した。  
25 残留物を逆相カラムクロマトグラフィー (コスモシール75C18-OPN、15×100 mm、展開溶媒は水) により精製した。

## 参考例 2 3 化合物 3 3 の合成

化合物 1 0 (1 0 . 5 m g , 5 . 3  $\mu$  m o l ) を上記の操作で 7 時間反応させたところ、目的とする化合物 3 3 (7 m g , 収率 7 6 % ) が得られた。得られた化合物は<sup>1</sup>H-NMR が標品と一致したことから確認した。

## 5 参考例 2 4 化合物 2 6 の合成

化合物 3 (8 . 0 m g , 3 . 8  $\mu$  m o l ) を上記の操作で 2 1 時間反応させたところ、目的とする化合物 2 6 (6 . 3 m g , 収率 8 8 % ) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (3 0 °C)

10  $\delta$  5 . 1 3 (s, 1 H, M a n 4 - H - 1), 5 . 0 7 (d, 1 H, J = 9 . 9 H z ,  
G l c N A c 1 - H - 1), 4 . 9 5 (s, 1 H, M a n 4 ' - H - 1), 4 . 7 8  
(s, 1 H, M a n 3 - H - 1), 4 . 6 2 (2 H, G l c N A c 2 , 5 ' - H -  
1), 4 . 5 6 (d, 1 H, J = 8 . 1 H z , G l c N A c 5 - H - 1), 4 . 5 2  
(d, 1 H, J = 7 . 8 H z , G a l 6 ' - H - 1), 4 . 2 5 (b s, 1 H, M  
15 a n 3 - H - 2), 4 . 1 9 (b s, 1 H, M a n 4 ' - H - 2), 4 . 1 2 (b s,  
1 H, M a n 4 - H - 2), 2 . 9 4 (d d, 1 H, J = 4 . 5 H z , 1 7 . 0 H z ,  
A s n -  $\beta$  C H), 2 . 8 5 (d d, 1 H, J = 6 . 8 H z , 1 7 . 0 H z , A s n  
-  $\beta$  C H), 2 . 6 8 (d d, 1 H, J = 4 . 6 H z , 1 2 . 4 H z , N e u A c  
7 ' - H - 3 e q), 2 . 0 8 , 2 . 0 7 , 2 . 0 6 , 2 . 0 4 , 2 . 0 2 (e a c h  
20 s, e a c h 3 H, A c), 1 . 7 2 (d d, 1 H, J = 1 2 . 1 H z , 1 2 . 1  
H z , N e u A c 7 ' - H - 3 a x); M S (F a b), C a l c d f o r C  
71 H118 N7 O51 [M+H+] 1 8 8 4 . 7 , f o u n d , 1 8 8 4 . 5

## 参考例 2 5 化合物 2 7 の合成

化合物 4 (1 1 . 0 m g , 5 . 8  $\mu$  m o l ) を上記の操作で 2 3 時間反応させた  
25 ところ、目的とする化合物 2 7 (8 . 5 m g , 収率 8 8 % ) で得られた。得られ  
た化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

δ 5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.08 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.95 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.78  
 (s, 1H, Man3-H-1), 4.62 (d, 2H, GlcNAc2,5'-H-1), 4.45 (d, 1H, J=7.6 Hz, Gal6'-H-1), 4.26  
 (bd, 1H, Man3-H-2), 4.12 (bd, 1H, Man4'-H-2), 4.08 (bdd, 1H, J=1.6 Hz, 3.3 Hz, Man4-H-2),  
 2.94 (dd, 1H, J=4.0 Hz, 17.2 Hz, Asn-βCH), 2.85 (dd, 1H, J=7.2 Hz, 17.2 Hz, Asn-βCH), 2.68 (d  
 10 d, 1H, J=4.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3eq), 2.09, 2.07, 2.04, 2.02 (each s, each 3H, Ac),  
 1.72 (dd, 1H, J=12.1 Hz, 12.1 Hz, NeuAc7'-H-3ax), ; MS (Fab), Calcd for C<sub>63</sub>H<sub>104</sub>N<sub>6</sub>NaO<sub>46</sub> [M+Na+] 1703.6, found, 1703.1

## 15 参考例 26 化合物 28 の合成

化合物 5 (7.0 mg, 4.0 μmol) を上記の操作で 21 時間反応させたところ、目的とする化合物 28 (5.3 mg, 収率 87%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30℃)

20 δ 5.07 (d, 1H, J=9.4 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.94 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc2,5'-H-1),  
 4.44 (d, 1H, J=7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.10, 4.07 (each 1H, Man4', 3-H-2), 2.93 (dd, 1H, J=4.6  
 25 Hz, 17.5 Hz, Asn-βCH), 2.85 (dd, 1H, J=7.0 Hz, 17.5 Hz, Asn-βCH), 2.67 (dd, 1H, J=4.6 Hz, 12.

2 Hz, NeuAc 7' -H-3 eq), 2.08, 2.06, 2.02, 2.01  
(each s, each 3H, Ac), 1.71 (2H, dd, J=12.2  
Hz, 12.2 Hz, NeuAc 7' -H-3 ax); MS (Fab), Calcd  
for  $C_{57}H_{94}N_6NaO_{41}$  [M+Na+] 1541.5, found,  
5 1541.3

#### 参考例 27 化合物 30 の合成

化合物 7 (13.9 mg, 6.6  $\mu$ mol) を上記の操作で 7 時間反応させたところ、目的とする化合物 30 (8.0 mg, 収率 64%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

#### 10 $^1H$ -NMR (30°C)

$\delta$  5.13 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H, J=9.9 Hz,  
GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4' -H-1), 4.77  
(s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each  
1H, J=8.0 Hz, GlcNAc 2,5-H-1), 4.55 (d, 1H, J=  
15 8.4 Hz, GlcNAc 5' -H-1), 4.44 (d, 1H, J=8.0 Hz,  
Gal 6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man 3-H-2), 4.19 (bd  
d, 1H, J=1.3 Hz, 3.2 Hz, Man 4' -H-2), 4.10 (bdd,  
1H, J=1.4 Hz, 3.2 Hz, Man 4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  
J=4.5 Hz, 16.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.80 (dd, 1H, J=  
20 7.5 Hz, 16.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.66 (dd, 1H, J=4.6  
Hz, 12.4 Hz, NeuAc 7-H-3 eq), 2.07, 2.06, 2.05,  
2.02, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1  
H, J=12.4 Hz, 12.4 Hz, NeuAc 7-H-3 ax); MS (Fa  
b), Calcd for  $C_{71}H_{117}N_7NaO_{51}$  [M+Na+] 1906.7,  
25 found, 1906.1

#### 参考例 28 化合物 31 の合成

化合物 8 (8.0 mg, 4.2  $\mu$ mol) を上記の操作で 12 時間反応させたところ、目的とする化合物 31 (6.0 mg, 収率 86%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30 $^{\circ}\text{C}$ )

5  $\delta$  5.12 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.59 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.43 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , Gal 6-H-1), 4.24 (bd, 1H, Man 3-H-2), 4.18 (bdd, 10 1H, Man 4'-H-2), 2.91 (bd, 1H,  $J=17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.81 (dd, 1H,  $J=6.5\text{ Hz}$ , 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.66 (dd, 1H,  $J=4.6\text{ Hz}$ , 12.6 Hz, NeuAc 7-H-3eq), 2.06, 2.06, 2.02, 2.00 (each s, each 3 H, Ac), 1.70 (dd, 1H,  $J=12.6\text{ Hz}$ , 12.6 Hz, NeuAc 7-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{63}\text{H}_{104}\text{N}_6\text{NaO}_{46}$  [M+Na+] 1703.6, found, 1703.0

#### 参考例 29 化合物 32 の合成

化合物 9 (7.7 mg, 4.4  $\mu$ mol) を上記の操作で 23 時間反応させたところ、目的とする化合物 32 (5.2 mg, 収率 78%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30 $^{\circ}\text{C}$ )

$\delta$  5.14 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.4\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.78 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.60 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.44 (d, 1H,  $J=8.0\text{ Hz}$ , Gal 6-H-1), 4.23 (d, 1H,  $J=3.0\text{ Hz}$ , Man 3-H-2), 4.19 (bdd, 1H,  $J=1.3\text{ Hz}$ ,



2.9 Hz, Man 4-H-2), 2.92 (dd, 1H,  $J=4.1$  Hz, 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.83 (dd, 1H,  $J=7.5$  Hz, 12.7 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.67 (dd, 1H,  $J=4.6$  Hz, 12.7 Hz, NeuAc 7-H-3eq), 2.06 (s, 6H, Ac $\times$ 2),  
5 2.03, 2.01 (each s, each 3H, Ac), 1.71 (dd, 1H,  $J=12.7$  Hz, 12.7 Hz, NeuAc 7-H-3ax); MS (Fab), Calcd for  $C_{57}H_{94}N_6NaO_{41}$  [M+Na+] 1541.5, found, 1541.2

#### 参考例 30 化合物 37 の合成

10 化合物 14 (9.1 mg, 5.0  $\mu$ mol) を上記の操作で 13 時間反応させたところ、目的とする化合物 37 (6.5 mg, 収率 77%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1$ H-NMR (30 $^{\circ}$ C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz, 15 GlcNAc 1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.57, 4.55 (each d, each 1H,  $J=7.5$  Hz, GlcNAc 2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.3$  Hz, Gal 6'-H-1), 4.23 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.10 (bs, 20 1H, Man 4-H-2), 2.87 (dd, 1H,  $J=4.8$  Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (dd, 1H,  $J=7.2$  Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.00 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{60}H_{100}N_6NaO_{43}$  [M+Na+] 1615.6, found, 1615.0

#### 25 参考例 31 化合物 42 の合成

化合物 19 (9.8 mg, 5.4  $\mu$ mol) を上記の操作で 13 時間反応させた

ところ、目的とする化合物 42 (8.0 mg, 収率 88%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ ,  
5 GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76  
(s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.57, 4.55 (each d,  
each 1H, GlcNAc2, 5, 5'-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=$   
7.8 Hz, Gal6-H-1), 4.28 (s, 1H, Man3-H-2),  
4.18 (s, 1H, Man4'-H-2), 4.10 (s, 1H, Man4-H  
10 -2), 2.88 (dd, 1H,  $J=4.0\text{ Hz}$ , 16.6 Hz, Asn- $\beta\text{ CH}$ ),  
2.77 (dd, 1H,  $J=7.5\text{ Hz}$ , 16.6 Hz, Asn- $\beta\text{ CH}$ ), 2.0  
7 (s, 3H, Ac), 2.04 (s, 6H,  $\text{Ac} \times 2$ ), 2.00 (s, 3H, A  
c); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{60}\text{H}_{101}\text{N}_6\text{O}_{43}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1  
593.6, found, 1593.8

#### 15 参考例 32 化合物 38 の合成

化合物 15 (5.1 mg, 3.2  $\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 38 (4.0 mg, 収率 91%) が得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

20  $\delta$  5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.4\text{ Hz}$ ,  
GlcNAc1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76  
(s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each  
1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , GlcNAc2, 5'-H-1), 4.47 (d, 1H,  $J=$   
7.8 Hz, Gal6'-H-1), 4.24 (d, 1H,  $J=2.3\text{ Hz}$ , Ma  
25 n3-H-2), 4.10, 4.06 (each bd, each 1H, Man  
4', 4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.2\text{ Hz}$ , 16.8 Hz, As

n- $\beta$ CH), 2.81 (dd, 1H,  $J=7.3$  Hz, 16.8 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{52}H_{88}N_5O_{38}$  [M+H+] 1390.5, found, 1390.1

5 参考例 33 化合物 72 の合成

化合物 70 (4.0 mg, 2.8  $\mu$ mol) を上記の操作で 13 時間反応させたところ、目的とする化合物 72 (2.9 mg, 収率 85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1$ H-NMR (30 $^{\circ}$ C)

10  $\delta$  5.09 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.8$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.10, 4.06 (each bs, each 1H, Man4, 4'-H-15 2), 2.87 (dd, 1H,  $J=17.2$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.76 (dd, 1H,  $J=6.5$  Hz, 17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{46}H_{78}N_5O_{33}$  [M+H+] 1228.5, found, 1228.3

20 参考例 34 化合物 43 の合成

化合物 20 (5.4 mg, 3.3  $\mu$ mol) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 43 (4.1 mg, 収率 87%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1$ H-NMR (30 $^{\circ}$ C)

25  $\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H,  $J=9.5$  Hz, GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77

(s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.46 (d, 1H, Gal6-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H-2), 2.90 (dd, 1H,  $J=4.0\text{Hz}$ ,  $17.0\text{Hz}$ , Asn- $\beta$ CH),  
 5 2.80 (dd, 1H,  $J=7.3\text{Hz}$ ,  $17.0\text{Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{52}\text{H}_{88}\text{N}_5\text{O}_{38}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1390.5, found, 1390.2

### 参考例 35 化合物 73 の合成

10 化合物 71 (4.0mg,  $2.8\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 13 時間反応させたところ、目的とする化合物 73 (2.9mg, 収率 85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.11 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.9\text{Hz}$ ,  
 15 GlcNAc1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.60, 4.54 (each d, each 1H,  $J=7.9\text{Hz}$ , GlcNAc2, 5-H-1), 4.24 (s, 1H, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H,  $J=1.6\text{Hz}$ ,  $1.6\text{Hz}$ , Man4-H-2), 3.96 (1H, dd,  $J=1.6\text{Hz}$ ,  $1.6\text{Hz}$ , Man4-H-2),  
 20 2.88 (dd, 1H,  $J=4.3\text{Hz}$ ,  $16.8\text{Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.77 (dd, 1H,  $J=7.2\text{Hz}$ ,  $16.8\text{Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.06, 2.04, 2.00 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{78}\text{N}_5\text{O}_{33}$   $[\text{M}+\text{H}^+]$  1228.5, found, 1228.3

### 25 参考例 36 化合物 39 の合成

化合物 16 (2.2mg,  $1.5\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 7 時間反応させたと

ころ、目的とする化合物 39 (1.6 mg, 収率 84%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.07 (d, 1H,  $J=9.7\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.92 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.75 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.62, 4.58 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.09, 4.08 (each s, each 1H, Man 3,4'-H-2), 2.91 (dd, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ ,  $16.9\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.81 (dd, 1H,  $J=6.8\text{ Hz}$ ,  $16.9\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.08, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{46}\text{H}_{77}\text{N}_5\text{NaO}_{33}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1250.4, found, 1250.3

#### 参考例 37. 化合物 40 の合成

化合物 17 (1.5 mg,  $1.2\text{ }\mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 14 時間反応させたところ、目的とする化合物 40 (1.1 mg, 収率 89%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

$^1\text{H-NMR}$  (30°C)

$\delta$  5.07 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.62, 4.55 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.10, 4.07 (each s, each 1H, Man 4',3-H-2), 2.89 (dd, 1H,  $J=3.7\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.79 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ ,  $17.0\text{ Hz}$ , Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{40}\text{H}_{67}\text{N}_5\text{NaO}_{28}$   $[\text{M}+\text{Na}^+]$  1088.4, found, 1088.2

## 参考例 38 化合物 41 の合成

化合物 18 (1.3 mg, 1.2  $\mu$ mol) を上記の操作で 14 時間反応させたところ、目的とする化合物 41 (0.8 mg, 収率 80%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

5  $^1\text{H-NMR}$  (30 $^{\circ}\text{C}$ )

$\delta$  5.07 (d, 1H,  $J=9.5\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.76 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.62 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , GlcNAc 2-H-1), 4.08 (d, 1H,  $J=2.9\text{ Hz}$ , Man 3-H-2), 2.92 (dd, 1H,  $J=3.9\text{ Hz}$ , 17.3 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.83 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ , 17.3 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $\text{C}_{32}\text{H}_{55}\text{N}_4\text{O}_{27}$  [M+H+] 863.3, found 863.2

## 参考例 39 化合物 44 の合成

15 化合物 21 (2.3 mg, 1.6  $\mu$ mol) を上記の操作で 7 時間反応させたところ、目的とする化合物 44 (1.6 mg, 収率 84%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

 $^1\text{H-NMR}$  (30 $^{\circ}\text{C}$ )

20  $\delta$  5.11 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.06 (d, 1H,  $J=9.8\text{ Hz}$ , GlcNAc 1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61, 4.57 (each d, each 1H, GlcNAc 2,5-H-1), 4.46 (d, 1H,  $J=7.8\text{ Hz}$ , Gal-H-1), 4.22, 4.18 (each bs, each 1H, Man 3,4-H-2), 2.91 (dd, 1H,  $J=4.1\text{ Hz}$ , 17.3 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.82 (dd, 1H,  $J=7.0\text{ Hz}$ , 17.3 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 2.04, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for

$C_{46}H_{78}N_5O_{33}$  [M+H<sup>+</sup>] 1228.5, found, 1228.3

参考例40 化合物45の合成

化合物22 (1.6 mg, 1.3  $\mu$ mol) を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物45 (1.1 mg, 収率85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

$\delta$  5.12 (s, 1H, Man4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61, 4.54 (each d, each 1H, GlcNAc2, 5-H-1), 4.22 (d, 1H, J=2.5 Hz, Man3-H-2), 4.18 (dd, 1H, J=1.4 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.89 (dd, 1H, J=4.3 Hz, 16.9 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.78 (dd, 1H, J=7.5 Hz, 16.9 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.06, 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{40}H_{67}N_5NaO_{28}$  [M+Na<sup>+</sup>] 1088.4, found, 1088.3

参考例41 化合物46の合成

化合物23 (1.6 mg, 1.5  $\mu$ mol) を上記の操作で14時間反応させたところ、目的とする化合物46 (1.1 mg, 6.4  $\mu$ mol, 収率85%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

$\delta$  5.10 (s, 1H, Man4-H-1), 5.06 (d, 1H, J=9.5 Hz, GlcNAc1-H-1), 4.77 (s, 1H, Man3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=7.3 Hz, GlcNAc2-H-1), 4.22 (d, 1H, J=2.4 Hz, Man3-H-2), 4.07 (dd, 1H, J=1.6 Hz, 3.0 Hz, Man4'-H-2), 2.90 (dd, 1H, J=4.3 Hz, 17.0 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.80 (dd, 1H, J=7.0 Hz,

17.2 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.05, 2.01 (each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{32}H_{55}N_4O_{23}$  [M+H]<sup>+</sup> 863.3, found 863.3

#### 参考例 4 2 化合物 3 4 の合成

5 化合物 1 1 (12.4 mg, 7.5  $\mu$ mol) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 3 4 (9.2 mg, 収率 86%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

10  $\delta$  5.11 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=10.0 Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.77 (s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H, J=6.8 Hz, GlcNAc 2-H-1), 4.55 (d, 2H, GlcNAc 5, 5'-H-1), 4.24 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.18 (bs, 1H, Man 4'-H-2), 4.10 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.80 (dd, 1H, J=3.8 Hz, 15.6 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.63 (dd, 1H, J=8.2 Hz, 15.6 Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.05 (s, 6H, Ac $\times$ 2), 2.01 (s, 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  $C_{54}H_{90}N_6NaO_{38}$  [M+Na]<sup>+</sup> 1453.5, found, 1453.2

#### 20 参考例 4 3 化合物 3 5 の合成

化合物 1 2 (12.0 mg, 8.4  $\mu$ mol) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目的とする化合物 3 5 (7.0 mg, 収率 81%) で得られた。得られた化合物の物理的データは以下の通りである。

<sup>1</sup>H-NMR (30°C)

25  $\delta$  5.10 (s, 1H, Man 4-H-1), 5.07 (d, 1H, J=9.7 Hz, GlcNAc 1-H-1), 4.91 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.78



(s, 1H, Man 3-H-1), 4.61 (d, 1H,  $J=8.0$  Hz, Glc  
NAc 2-H-1), 4.25 (bs, 1H, Man 3-H-2), 4.06 (bs,  
1H, Man 4'-H-2), 3.97 (bs, 1H, Man 4-H-2), 2.7  
9 (dd, 1H,  $J=5.0$  Hz,  $17.0$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.61 (d  
5 d, 1H,  $J=7.3$  Hz,  $17.0$  Hz, Asn- $\beta$ CH), 2.07, 2.01  
(each s, each 3H, Ac); MS (Fab), Calcd for  
 $C_{38}H_{65}N_4O_{28}$  [M+H+] 1025.4, found, 1025.2

#### 参考例 44 化合物 36 の合成

化合物 13 ( $8.4 \mu\text{mol}$ ) を上記の操作で 11 時間反応させたところ、目  
10 的とする化合物 36 で得られた。

#### 参考例 45 化合物 76、77 の合成および単離

化合物 2 及び化合物 6 の混合物 ( $5.0 \text{ mg}$ ,  $2.2 \mu\text{mol}$ ) を  $220 \mu\text{L}$  の  
水に溶解させ、 $22 \text{ mM}$  の炭酸セシウム水溶液を  $100 \mu\text{L}$  加え、 $\text{pH } 7.0$  と  
した。この溶液を凍結乾燥した。乾燥後の固形物に  $N,N$ -ジメチルホルムアミ  
15 ドを  $430 \mu\text{L}$  加え、更に  $6.6 \mu\text{mol}$  のベンジルプロマイド/ $N,N$ -ジメチ  
ルホルムアミド溶液を  $20 \mu\text{L}$  加えた。この溶液をアルゴン雰囲気下で攪拌した。  
48 時間後、TLC (展開溶媒は  $1 \text{ M } \text{NH}_4\text{OAc} : \text{イソプロパノール} = 1 :$   
2 を用いた) にて原料の消失を確認した後、 $4.4 \text{ mL}$  のジエチルエーテルを加  
えて化合物を沈殿させた。沈殿した糖鎖を濾過し、残った糖鎖を水に溶解させ凍  
20 結乾燥した。凍結乾燥後の残留物を分取 HPLC (YMC Packed Co  
lumn D-ODS-5 S-5 120A ODS No. 2020178、  
 $20 \times 250 \text{ mm}$ 、展開溶媒は  $50 \text{ mM}$  酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリ  
ル =  $78 : 22$ 、流速  $4.0 \text{ mL/min}$ ) で精製したところ、88 分後に化合  
物 77 が、91 分後に化合物 76 が溶出した。それぞれを取り分け、更に ODS  
25 カラム (コスモシル 75C18-OPN、 $15 \times 100 \text{ mm}$ 、最初に  $\text{H}_2\text{O}$  を  
 $50 \text{ mL}$  流し、次に  $25\%$  アセトニトリルを流して溶出させた) で脱塩したとこ

ろ、化合物2のベンジル体が1.6mg、化合物6のベンジル体が1.8mg得られた。

化合物2のベンジル体(10糖、13.6mg、5.8mmol)を、氷冷下にNaOH aq. (pH=12) 1.4mlに溶解させた。反応をHPLCでモニターしながら約8時間攪拌した。反応の進行が終了した時点で、反応液を40mM HClにてpH=7.0に調整した。中和後の液を、メンブランフィルターで濾過した後、濃縮、次いでHPLC (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=20/80, 7.0ml/min., wavelength; 274nm) 10にて分取・精製を行った。分取した液を濃縮後、ODSカラム(コスモシル75C<sub>18</sub>-OPN, ナカライテスク社製)にて脱塩処理を行い、濃縮、凍結乾燥を行うと、化合物2の単品(6.2mg, 47.4%)が得られた。

得られた化合物2(4.0mg, 1.76mmol)に、DMSO 282mlを加え溶解させた。この反応液に、モルホリン282mlを加えて室温下に攪拌を行った。反応を、TLCにてモニターしながら約1時間反応を行った。原料が消失したことを確認した後、反応液にアセトン/ジイソプロピルエーテル(IP 15 E)=1/1の溶液5mlを加える。このスラリーを、メンブランフィルターにてろ過を行った後、残渣を精製水で溶出させた。水層を濃縮後、ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25, H<sub>2</sub>O)にて精製を行った。目的物の含まれる分画を集め濃縮後、凍結乾燥を行うと、目的とするモノシアロ糖 20 鎖アスパラギン(化合物76)(3.3mg, 91.5% yield)が得られた。化合物76のNMRデータを以下に示す。

<sup>1</sup>H-NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

δ 5.22 (s, 1H, Man4-H1), 5.15 (d, 1H, J=10.0, 25 GlcNAc1-H1), 5.01 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.85 (s, 1H), 4.65-4.75 (m, 3H), 4.54 (dd, 2H, J<sub>a</sub>=1

0.8,  $J_b = 7.6$ ), 4.33 (s, 1H), 4.27 (bd, 1H,  $J = 2.4$ , Man4-H2), 4.19 (bd, 1H,  $J = 2.4$ ), 2.95 (dd, 1H,  $J_a = 16.8$ ,  $J_b = 4.4$ , Asn- $\beta$ CH), 2.82 (dd, 1H,  $J_a = 16.8$ ,  $J_b = 7.2$ , Asn- $\beta$ CH) 2.74 (dd, 1H,  $J_a = 12.4$ ,  $J_b = 4.4$ , NeuAc7-H3eq), 2.16, 2.15, 2.13, 2.11, 2.09 (each s, 15H, Acx5), 1.83 (dd, 1H,  $J_a = 12.4$ ,  $J_b = 12.0$ , NeuAc7-H3ax).

化合物6のベンジル体(10糖、5.0mg、2.1mmol)を、氷冷下にNaOH aq. (pH=12) 2.0mlに溶解させた。反応をHPLCでモニターしながら約5時間攪拌した。反応の進行が終了した時点で、反応液を40mM HClにてpH=7.0に調整した。中和後の液を、メンブランフィルターで濾過した後、濃縮、次いでHPLC (YMC-Pack ODS-AM, SH-343-5AM, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=20/80, 7.0ml/min., wavelength; 274nm)にて分取・精製を行った。分取した液を濃縮後、ODSカラム(コスモシル 75C<sub>18</sub>-OPN, ナカライテスク社製)にて脱塩処理を行い、濃縮、凍結乾燥を行うと、化合物6の単品(2.5mg, 52.0%)が得られた。

得られた化合物6(1.5mg, 0.67mmol)に、DMSO 105mlを加え溶解させた。この反応液に、モルホリン105mlを加えて室温下に攪拌を行った。反応を、TLCにてモニターしながら約1時間反応を行った。原料が消失したことを確認した後、反応液にアセトン/ジイソプロピルエーテル(IPE)=1/1の溶液5mlを加えた。このスラリーを、メンブランフィルターにてろ過を行った後、残渣を精製水で溶出させた。水層を濃縮後、ゲルカラムクロマトグラフィー(Sephadex G-25, H<sub>2</sub>O)にて精製を行った。目的物の含まれる分画を集め濃縮後、凍結乾燥を行うと、目的とするモノシアロ糖鎖アスパラギン(化合物77)(1.4mg, 99% yield)が得られた。

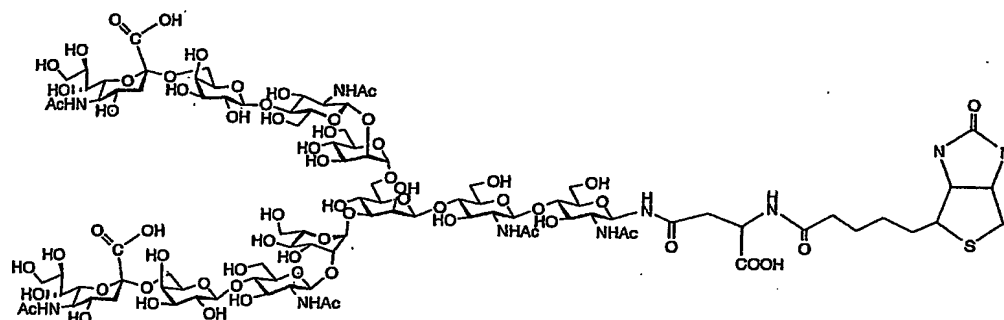
化合物 77 の NMR データを以下に示す。

$^1\text{H}$ -NMR (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C, HOD=4.81)

$\delta$  5.20 (s, 1H, Man4-H1), 5.15 (d, 1H,  $J=9.6$ ,  
GlcNAc1-H1), 5.02 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.85  
5 (s, 1H), 4.63-4.73 (m, 3H), 4.53 (dd, 2H,  $J_a=$   
7.6,  $J_b=7.2$ ), 4.33 (s, 1H), 4.27 (bd, 1H,  $J=2.4$ ,  
Man4-H2), 4.19 (d, 1H,  $J=2.0$ ), 2.83 (dd, 1H,  
 $J_a=16.0$ ,  $J_b=4.0$ , Asn- $\beta$ CH), 2.75 (dd, 1H,  $J_a=$   
12.4,  $J_b=4.8$ , NeuAc7-H3eq) 2.62 (dd, 1H,  $J_a=$   
10 =16.0  $J_b=8.0$ , Asn- $\beta$ CH), 2.16, 2.14, 2.13, 2.1  
1, 2.09 (each s, 15H, Acx5), 1.79 (dd, 1H,  $J_a=$   
12.4,  $J_b=11.6$ , NeuAc7-H3ax).

#### 実施例 1

参考例 1 で得られた化合物 24 (6 mg, 2.58 mmol) を水 (300 mL)  
15 L) 溶かし重炭酸ナトリウム (2.1 mg, 24.9 mmol) を加えた。ここに、  
D-(+)-ピオチニルスクシンイミド (4.2 mg, 12.3 mmol) を溶か  
したジメチルホルムアミド (300 mL) を加え、室温で 20 分反応させた。原  
料消失を TLC (イソプロパノール : 1M 酢酸アンモニウム水溶液 = 3 : 2)  
で確認後、エバポレーターを用いて濃縮した。残渣をゲルろ過カラム (f 20 m  
20 m $\times$ 300 mm, Sephadex G-25, 水) で精製し、目的とする化合  
物 (6.2 mg, 94%) を得た。得られた化合物の物理的データは以下の通り  
である。

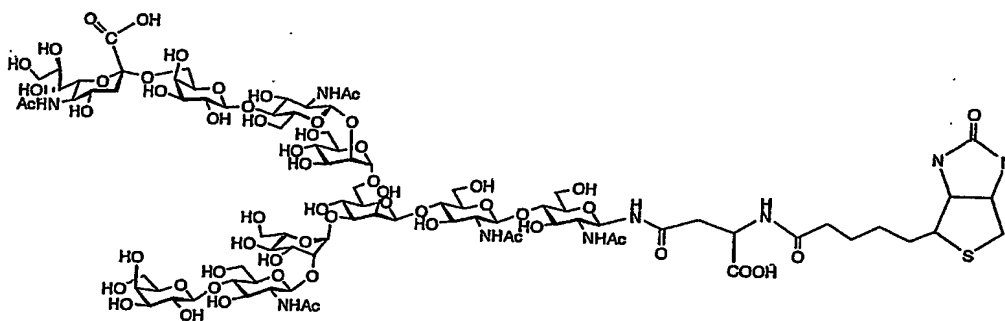


$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , 30°C,  $\text{HOD}=4.81$ )

d 5.22 (s, 1H, Man 4-H1), 5.14 (d, 1H, GlcNAc 1-H1), 5.03 (s, 1H, Man 4'-H-1), 4.59 (dd, 1H),  
 5 4.86 (s, 1H, Man 3-H1), 4.74-4.66 (m, 3H, GlcNAc 2, 5, 5'-H1), 4.53 (d, 2H, Gal 6, 6'-H1), 4.34 (s, 1H, Man 3-H2), 4.28 (bs, 1H, Man 4-H2),  
 4.19 (bs, 1H, Man 4'-H2), 3.09 (dd, 2H, NeuAc 7, 7'-H3eq), 2.94-2.86 (m, 2H, biotin), 2.78-  
 10 2.71 (m, 2H, biotin), 2.37 (t, 1H, biotin), 2.17, 2.16, 2.13, 2.11 (each s, Ac), 1.80 (dd, 2H, NeuAc 7, 7'-H3ax), 1.80-1.67 (m, biotin), 1.52-1.47 (m, biotin), 1.32 (dd, biotin)

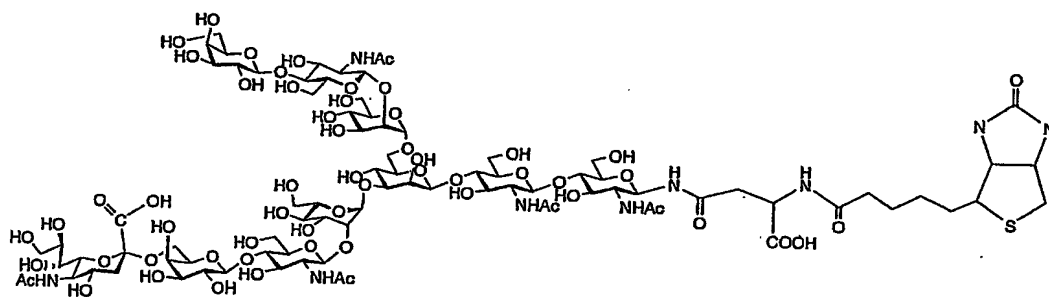
## 実施例 2

15 参考例 45 で得られた化合物 76 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



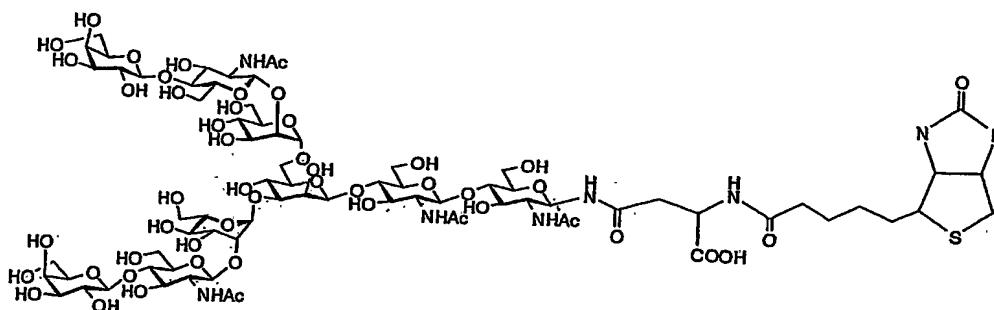
### 実施例 3

参考例 4 5 で得られた化合物 7 7 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン  
5 化を行った。



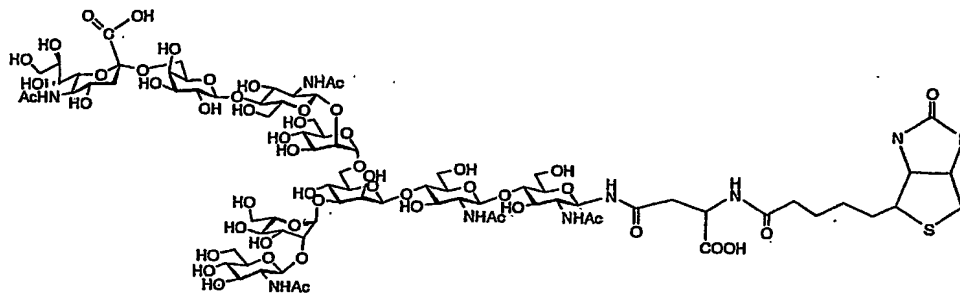
### 実施例 4

参考例 7 で得られた化合物 3 3 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化  
10 を行った。



## 実施例 5

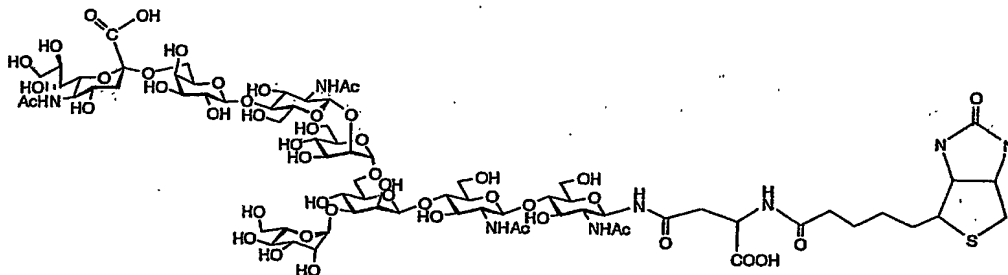
参考例 2 4 で得られた化合物 2 6 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



5

## 実施例 6

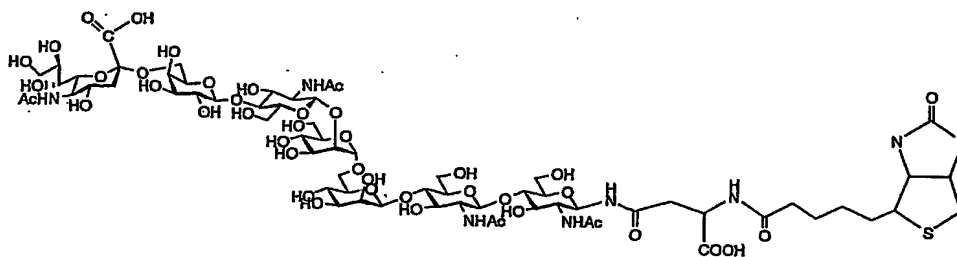
参考例 2 5 で得られた化合物 2 7 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



10

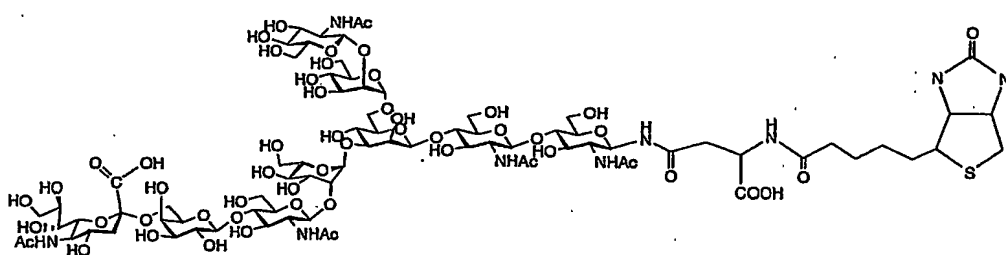
## 実施例 7

参考例 2 6 で得られた化合物 2 8 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



## 実施例 8

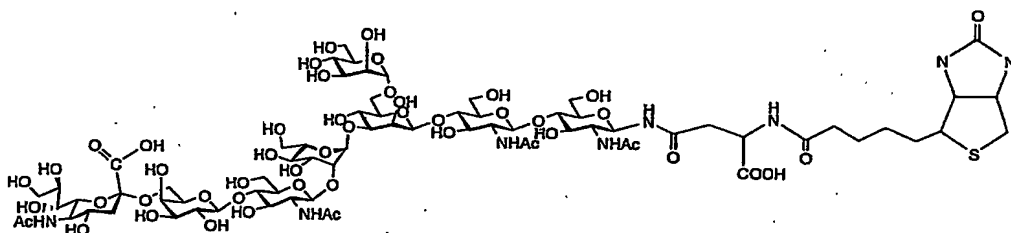
参考例 27 で得られた化合物 30 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



5

## 実施例 9

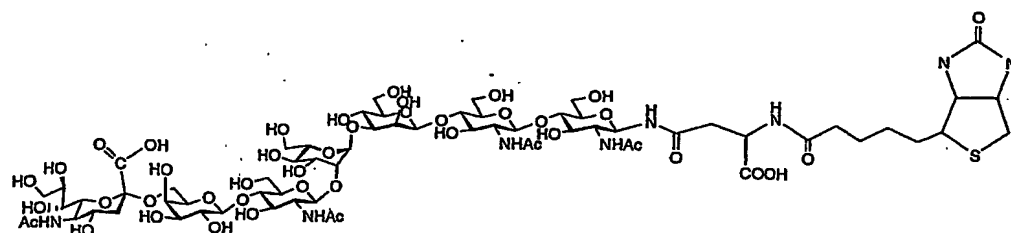
参考例 28 で得られた化合物 31 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



10

## 実施例 10

参考例 29 で得られた化合物 32 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



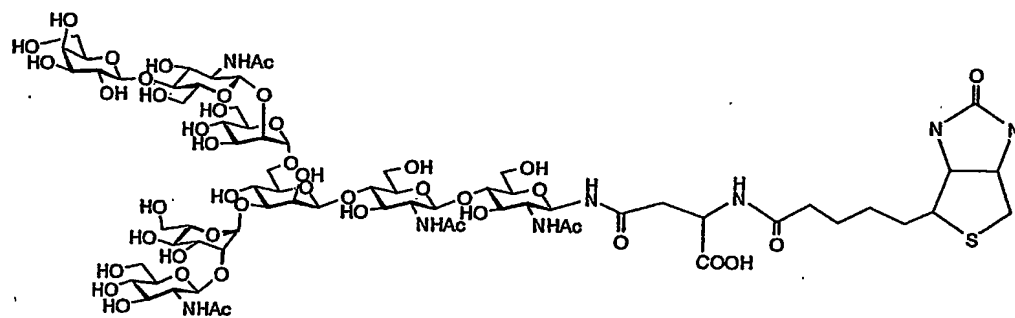
15



## 実施例 1 1

参考例 3 0 で得られた化合物 3 7 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

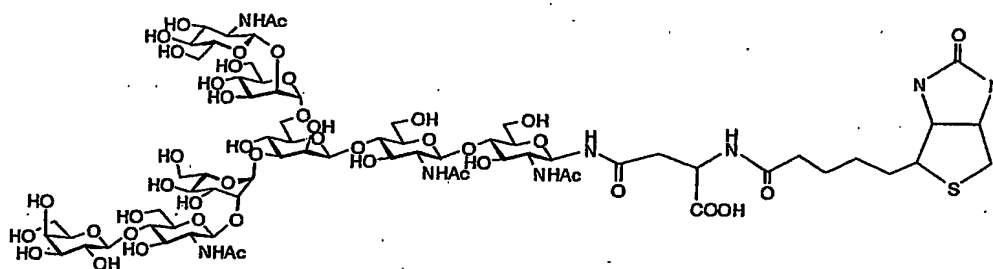
5



## 実施例 1 2

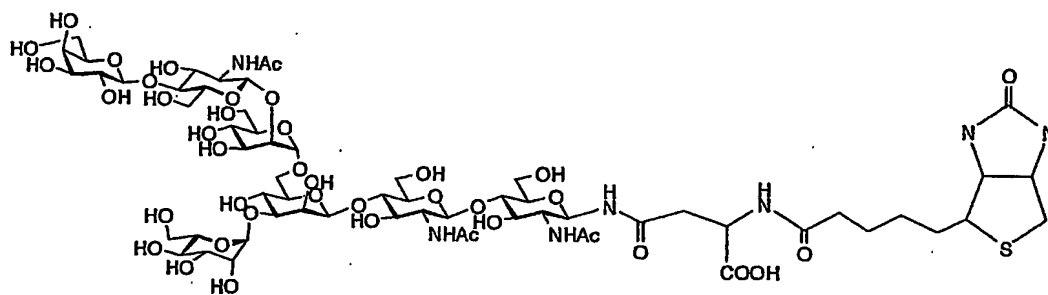
参考例 3 1 で得られた化合物 4 2 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

10



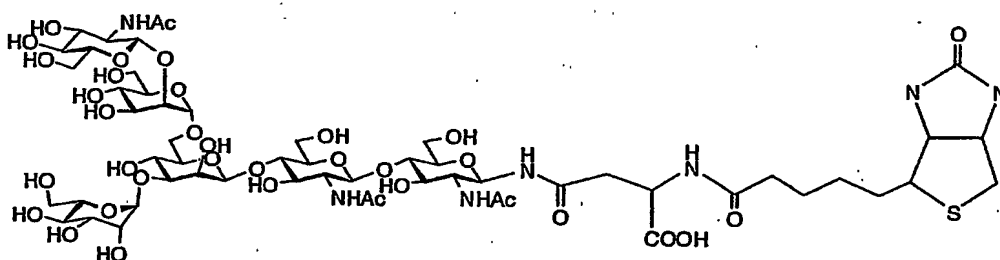
## 実施例 1 3

参考例 3 2 で得られた化合物 3 8 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



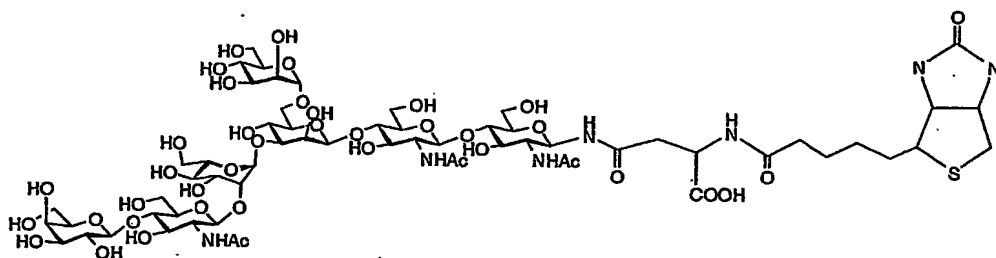
#### 実施例 1 4

参考例 3 3 で得られた化合物 7 2 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン  
5 化を行った。



#### 実施例 1 5

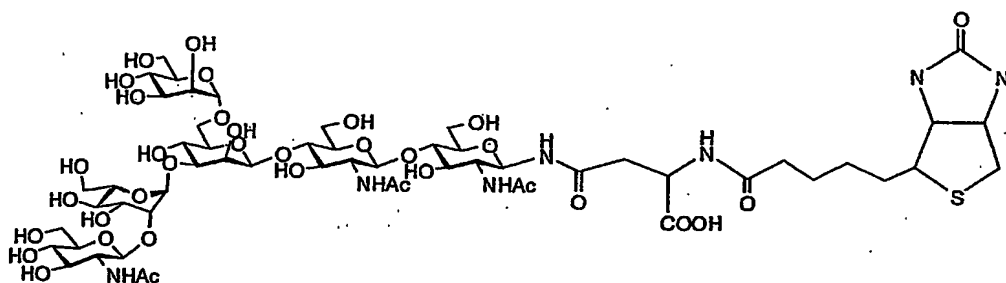
参考例 3 4 で得られた化合物 4 3 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン  
10 化を行った。



#### 実施例 1 6

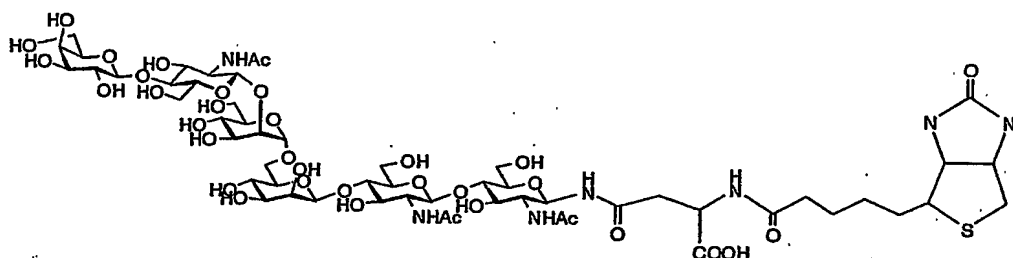
参考例 3 5 で得られた化合物 7 3 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン

化を行った。



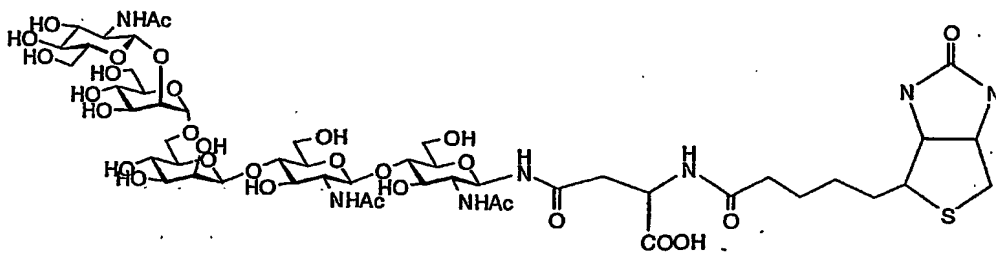
#### 実施例 1 7

- 5 参考例 3 6 で得られた化合物 3 9 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



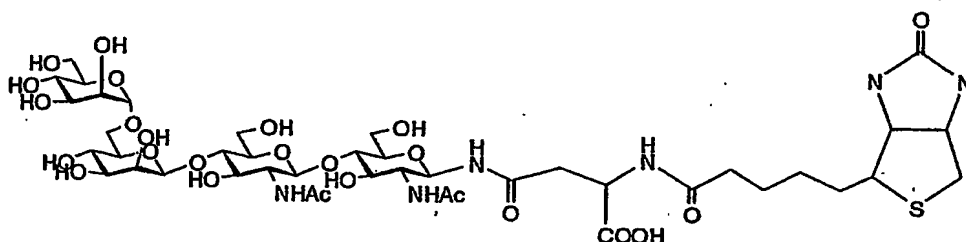
#### 実施例 1 8

- 10 参考例 3 7 で得られた化合物 4 0 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



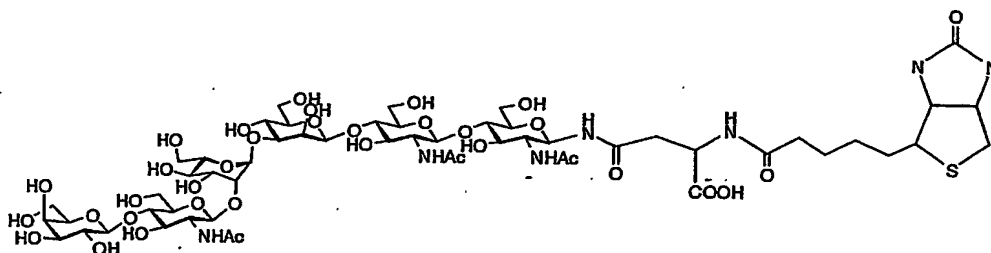
#### 実施例 1 9

参考例 38 で得られた化合物 41 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



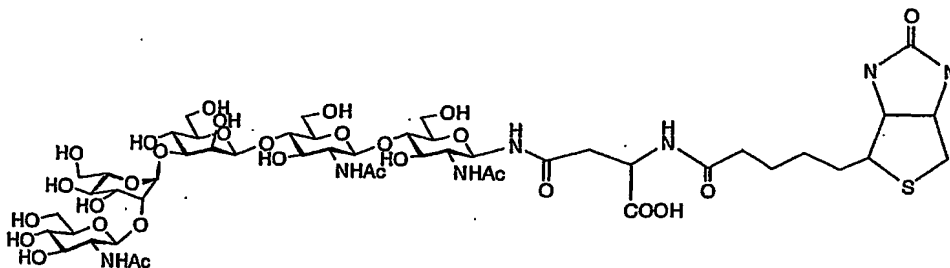
## 5 実施例 20

参考例 39 で得られた化合物 44 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



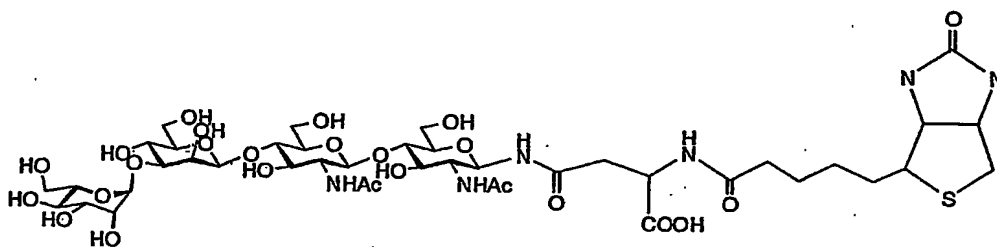
## 10 実施例 21

参考例 40 で得られた化合物 45 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



## 実施例 2 2

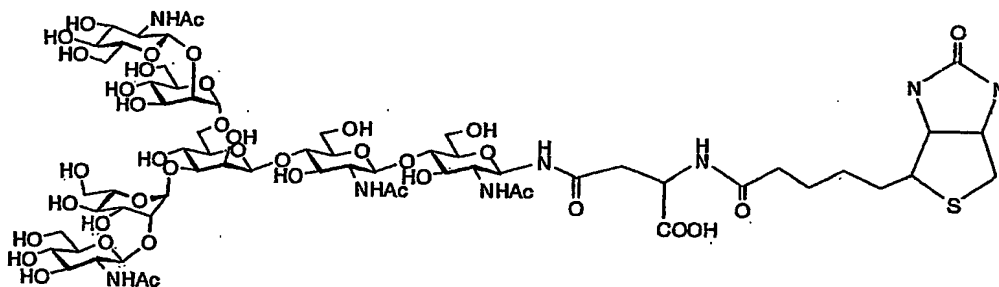
参考例 4 1 で得られた化合物 4 6 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



5

## 実施例 2 3

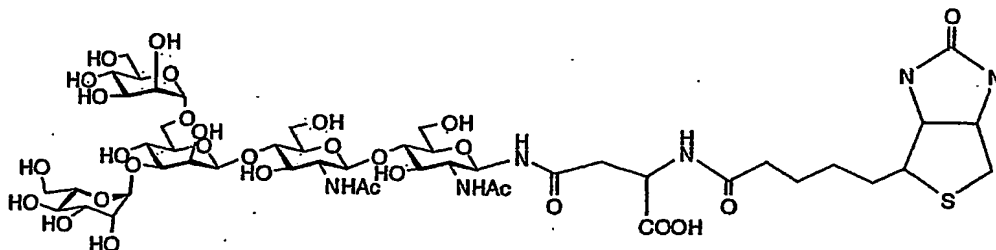
参考例 4 2 で得られた化合物 3 4 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



10

## 実施例 2 4

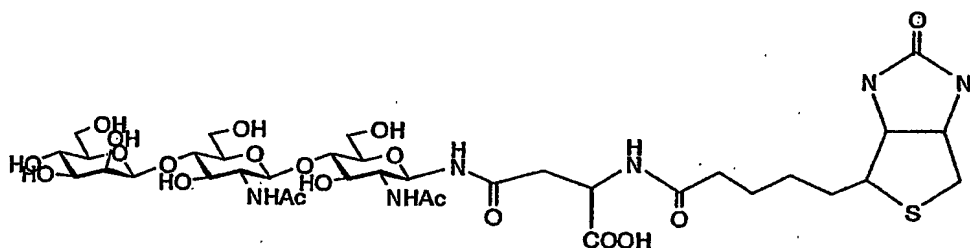
参考例 4 3 で得られた化合物 3 5 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



15

## 実施例 2 5

参考例 4 4 で得られた化合物 3 6 を使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



5

実施例 2 6 Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ  $\alpha$  2, 3 糖鎖アスパラギン (C 1 - 1) および Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護した 2 種のモノシアロ  $\alpha$  2, 3 糖鎖アスパラギン (C 1 - 2 及び C 1 - 3) の合成

10 参考例 2 で得られた Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したアシアロ糖鎖アスパラギンにシアル酸転移酵素を用いて CMP - シアル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として  $\alpha$  2, 3 転移酵素である市販の Rat, Recombinant 由来のものを用いた。

15 参考例 2 で得られたアシアロ 9 糖 (20 mg, 10.1  $\mu$ mol) を 50 mM カコジル酸緩衝液 (pH = 6.0, 5 ml) に溶解させた後、牛血清アルブミン (BSA, 5 mg) を加える。これに、CMP - シアル酸 (26 mg, 40.4  $\mu$ mol)、Alkaline phosphatase (5  $\mu$ l, 125 unit) を加え均一化する。最後に、 $\alpha$  2, 3 - Sialyltransferase (CALBIOCHEM 社製、100  $\mu$ l) を加え 37  $^{\circ}$ C で 48 時間静置させる。HPLC で反応をモニターしながら原料が目的量まで減少した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を

20

減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20×250mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=18/82, 7.5ml/min., wave length; 274nm) ところ、25分後にジシアロ11糖 化合物 (C1-1) が、それぞれ30分後、34分後に各モノシアロ10糖 化合物 (C1-2) 及び (C1-3) が溶出してきた。それぞれを分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物1、2、3がそれぞれ0.7mg (2.7%)、1.9mg (8.3%)、3.5mg (15.3%) 得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。

10 化合物 (C1-1)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.91 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m, 4H), 4.34 (1H, Fmoc), 4.24 (bs, 1H, Man3-H2), 4.18 (bs, 1H, Man4-H2), 4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 3H, Asn-βCH, NeuAc7, 7'-H3eq), 2.40-2.60 (m, 1H, Asn-βCH), 2.05, 2.03, 2.02 (each s, Ac), 1.77 (dd, 2H, NeuAc7, 7'-H3ax).

化合物 (C1-2)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

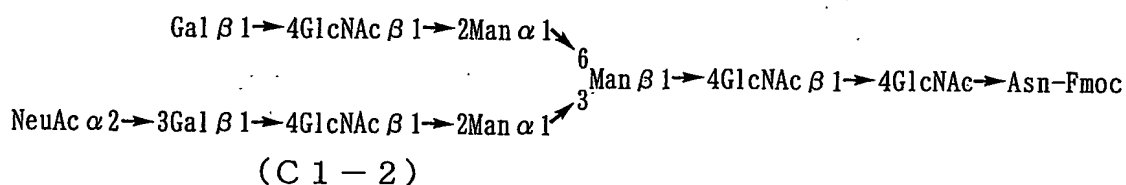
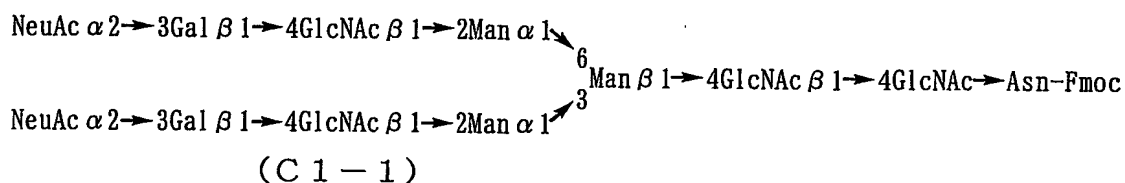
δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.47-4.60 (m); 4.43 (d, 1

H), 4.32 (1H, Fmoc), 4.22 (bs, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.06-4.13 (m, 2H), 2.72 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.50-2.60 (m, 1H, Asn-βCH), 2.05, 2.03, 2.01 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax).

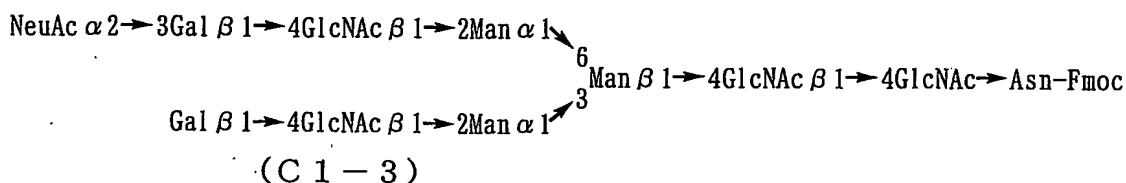
化合物 (C1-3)

<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)

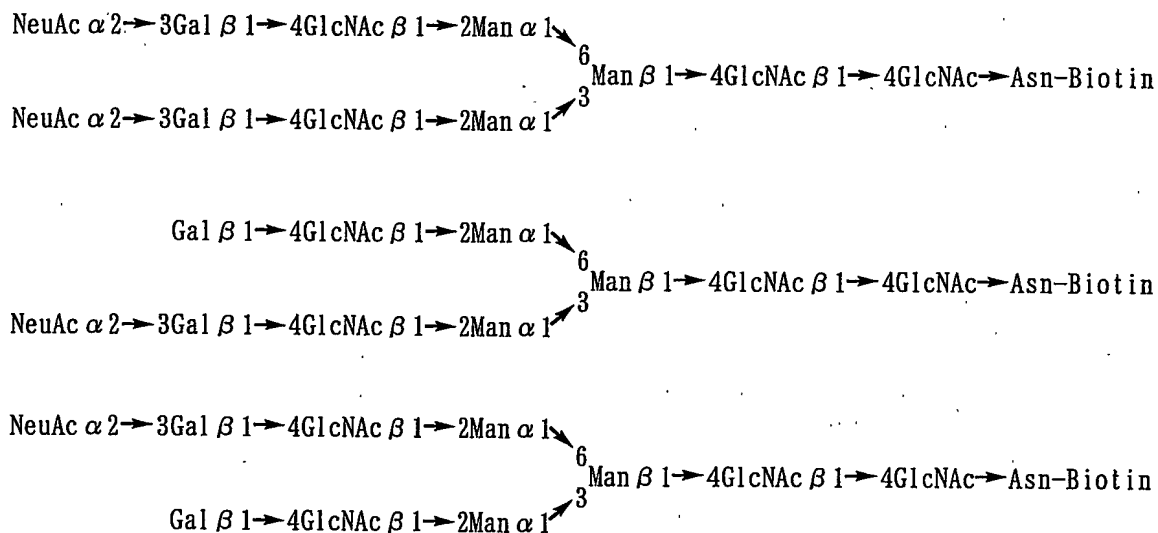
δ 7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49 (dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1H, Man4-H1), 4.97 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.45 (d, 1H), 4.33 (1H, Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2), 4.09 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc7-H3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn-βCH), 2.05, 2.03, 2.02, 2.00 (each s, Ac), 1.77 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)







得られた (C-1) ~ (C-3) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



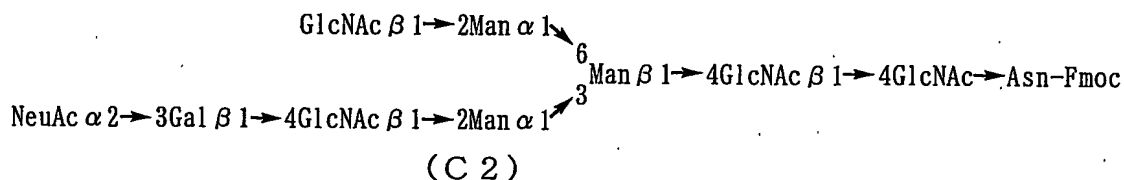
## 10 実施例 27

実施例 26 で得られた化合物 (C1-2) (2 mg, 0.88  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 1 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 100  $\mu\text{l}$  に溶解させ、さらに  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (生化学工業社製、from Jack Beans, 5  $\mu\text{L}$ , 100 mU) を加えた。この溶液を 37℃ で 15 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$  × 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 82 : 18、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃

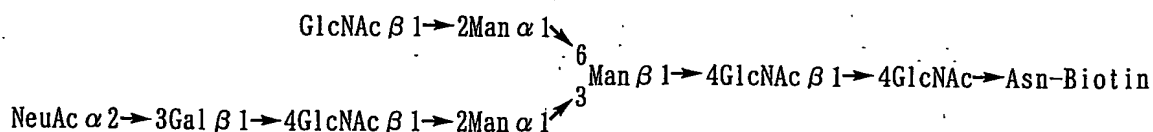
縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水  $200\mu\text{l}$  に溶解させ ODS-カラム  
クロマトグラフィー（コスモシール  $75\text{C}_{18}\text{-open}$ 、最初に水で洗浄を行い、  
次いで  $25\%$  アセトニトリル水溶液で溶出させる）を用いて脱塩処理を行ったと  
ころ、目的とする化合物（C2）が  $0.5\mu\text{g}$  得られた。NMR データは以下の  
5 とおりである。

$^1\text{H}$  NMR ( $400\text{MHz}$ ,  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ,  $\text{HOD}=4.81$ )

$\delta$  7.90 (d, 2H, Fmoc), 7.69 (d, 2H, Fmoc), 7.49  
(dd, 2H, Fmoc), 7.42 (dd, 2H, Fmoc), 5.10 (s, 1  
H, Man4-H1), 4.98 (d, 1H, GlcNAc1-H1), 4.90  
10 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.50-4.60 (m), 4.33 (1H,  
Fmoc), 4.22 (m, 2H), 4.17 (bs, 1H, Man4-H2),  
4.10 (m, 2H), 2.74 (m, 2H, Asn- $\beta\text{CH}$ , NeuAc7-H  
3eq), 2.45-2.60 (m, 1H, Asn- $\beta\text{CH}$ ), 2.05, 2.03,  
2.01 (each s, Ac), 1.78 (dd, 1H, NeuAc7-H3ax)  
15 x)



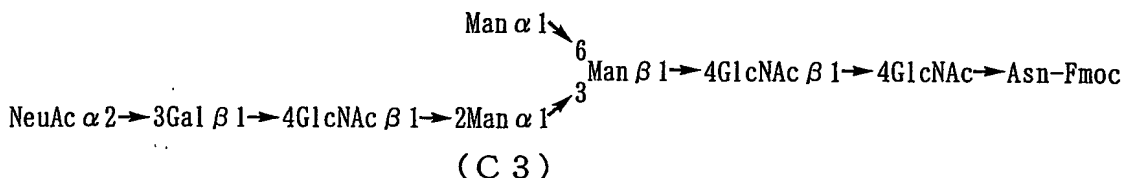
得られた (C2) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護し  
て糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例  
1 と同様にビオチン化を行った。



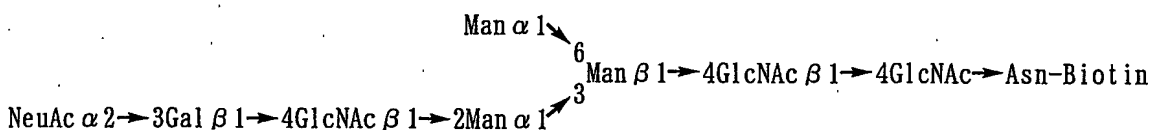
実施例 27 で得られた化合物 (C2) (1.8 mg, 0.86  $\mu$ mol) を、ウシ血清アルブミン 1 mg と共に HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 90  $\mu$ l に溶解させ、さらに N-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) を 4  $\mu$ l (250 mU) 加えた。この溶液を 37℃ で 24 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 82 : 18、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200  $\mu$ l に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C<sub>18</sub>-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C3) が 0.9  $\mu$ g 得られた。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD = 4.81)

$\delta$  8.01 (d, 2H, J = 7.6, Fmoc), 7.80 (d, 2H, J = 7.6, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J = 7.6, Fmoc), 7.53 (dd, 2H, J = 7.6, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1), 5.09 (d, 1H, J = 8.8, GlcNAc1-H1), 5.00 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.87 (s, 1H), 4.60-4.78 (m, 5H), 4.40-4.50 (bm, 2H), 4.34 (s, 1H), 4.28 (bs, 1H, Man4-H2), 4.20 (dd, 1H, J<sub>a</sub> = 3.0, J<sub>b</sub> = 9.9), 2.80-2.95 (m, 2H, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.65-2.75 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.16, 2.14, 2.12 (each s, Ac  $\times$  3), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, J<sub>a</sub> = 12.1, J<sub>b</sub> = 11.9, NeuAc7-H3ax).



得られた (C 3) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。



5

## 実施例 2 9

実施例 2 8 で得られた化合物 (C 3) (0.8 mg, 0.42  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 1 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50  $\mu\text{l}$  に溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 30  $\mu\text{l}$  (2.9 U) 加えた。この溶液を 37  $^{\circ}\text{C}$  で 63 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$   $\times$  25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 80 : 20、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200  $\mu\text{l}$  に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C<sub>18</sub>-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C 4) が 0.6  $\mu\text{g}$  得られた。

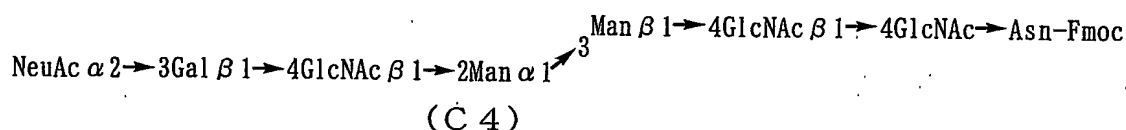
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30  $^{\circ}\text{C}$ , HOD = 4.81)

$\delta$  8.00 (d, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.79 (d, 2H, J =

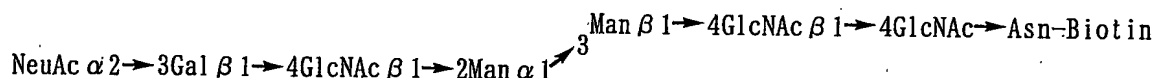
7.2, Fmoc), 7.59 (dd, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.52 (dd, 2H, J = 7.2, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man 4-H1),

20

5.09 (d, 1H,  $J=10.0$ , GlcNAc1-H1), 4.60–4.75 (m.), 4.40–4.50 (m, 2H), 4.32 (bd, 1H,  $J=2.3$ ), 4.28 (bs, 1H), 4.22 (bdd, 1H,  $J_a=9.7$ ,  $J_b=2.8$ , Man4-H2), 2.80–2.95 (m, 2H, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.60–2.75 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.14, 2.14, 2.12 (each s, Acx3), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.88 (dd, 1H,  $J_a=12.1$ ,  $J_b=12.0$ , NeuAc7-H3ax).



得られた(C4)の化合物を参考例7と同様に処理してFmoc基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例1と同様にビオチン化を行った。



### 実施例30

15 実施例26で得られた化合物(C1-3)(1mg,  $0.44 \mu\text{mol}$ )とウシ血清アルブミン1mgをHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0)  $50 \mu\text{l}$ に溶解させ、さらに $\beta$ -ガラクトシダーゼ(生化学工業社製、from Jack Beans,  $5 \mu\text{L}$ , 100mU)を加えた。この溶液を37℃で15時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、 $2.0 \phi \times 25 \text{cm}$ 、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液：アセトニトリル=82：18、流速 $7.5 \text{ml/min}$ )で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 $200 \mu\text{l}$ に溶解させODS-カラムクロマトグラフィー(コスモシール75C<sub>18</sub>-open、最初に水で洗浄を行い、次

20

いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物(C5)が0.3  $\mu$ g得られた。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30°C, HOD=4.81) $\delta$  8.01 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.81 (d, 2H, J=

5 7.2, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.53 (d

d, 2H, J=7.2, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1),

5.09 (d, 1H, J=9.6, GlcNAc1-H1), 5.02 (s, 1H,

Man 4' -H-1), 4.55-4.70 (m), 4.44 (1H, Fmoc),

4.30–4.38 (bm, 2H), 4.28 (bd, 1H, Man4–H2),

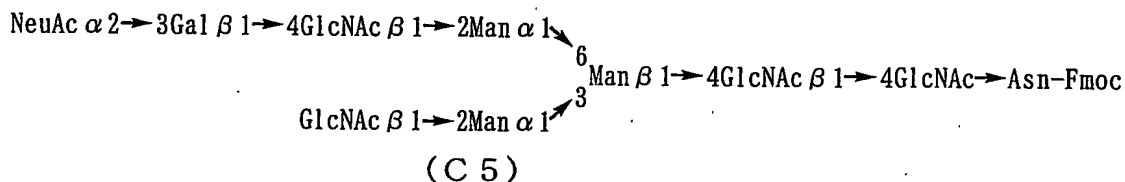
10 4.17–4.25 (m, 2H), 2.78–2.95 (m, 2H, Asn- $\beta$ CH<sub>2</sub>),

NeuAc 7-H 3 eq), 2.55–2.70 (m, 1H, Asn-βCH),

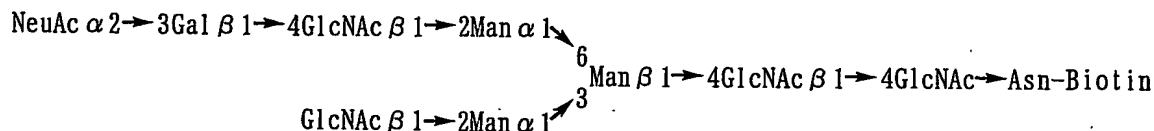
2.16, 2.15, 2.14, 2.12 (each s, 12H, Acx4),

1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H,  $J_a=12.2$ ,  $J_b=$

1 2. 0, N e u A c 7 - H 3 a x) .



得られた (C 5) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 1 と同様にピオチン化を行った。

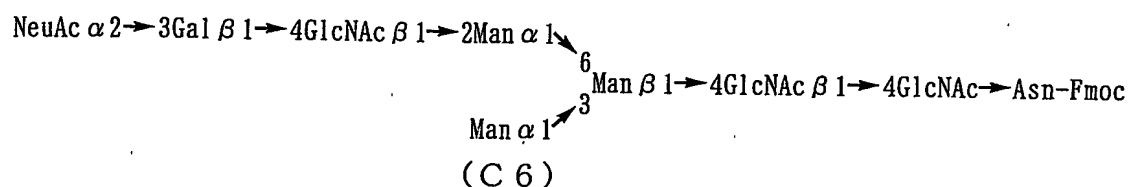


## 20 实施例 31

実施例30で得られた化合物(C5)(1.0mg, 0.48 $\mu$ mol)を、ウ

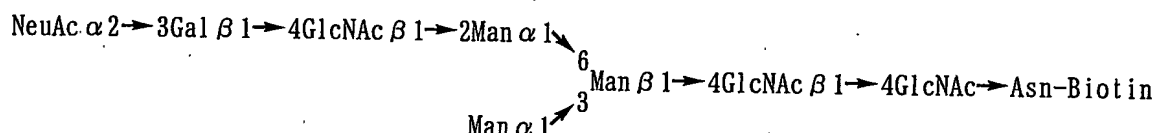
シ血清アルブミン1mgと共にHEPES緩衝溶液(50mM, pH5.0) 50 $\mu$ lに溶解させ、さらにN-アセチル- $\beta$ -グルコサミニダーゼ(シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans)を4 $\mu$ l(250mU)加えた。この溶液を37 $^{\circ}$ Cで22時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液をHPLC(ODSカラム、2.0 $\phi$  $\times$ 25cm、展開溶媒は50mM酢酸アンモニウム水溶液:アセトニトリル=82:18、流速7.5ml/min)で精製した後、溶媒を濃縮、次いで凍結乾燥を行った。残留物を水200 $\mu$ lに溶解させODS-カラムクロマトグラフィー(コスモシール75C<sub>18</sub>-open、最初に水で洗浄を行い、次いで25%アセトニトリル水溶液で溶出させる)を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物(C6)が0.6 $\mu$ g得られた。

$^1\text{H}$  NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30 $^{\circ}$ C, HOD=4.81)  
 $\delta$  8.01 (d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.80 (d, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J=7.6, Fmoc), 7.53 (dd, 2H, J=7.6, Fmoc), 5.19 (s, 1H, Man4-H1), 5.09 (d, 1H, J=9.2, GlcNAc1-H1), 5.02 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.85 (s, 1H) 4.58-4.75 (m, 5H), 4.38-4.48 (m, 2H, Fmoc), 4.40 (bd, J=2.4, 1H), 4.18-4.25 (m, 2H), 4.15 (m, 1H), 2.80-2.95 (m, 2H, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.65-2.75 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.16, 2.13, 2.12 (each s, 9H, Ac $\times$ 3), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, J<sub>a</sub>=12.2, J<sub>b</sub>=12.0, NeuAc7-H3ax):



得られた (C 6) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。

5



### 実施例 3 2

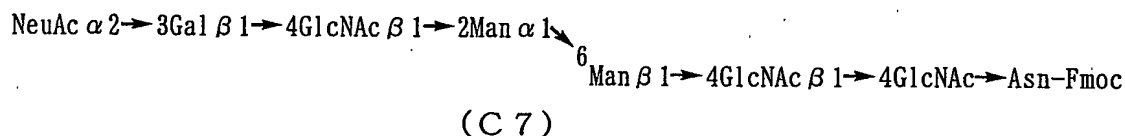
実施例 3 1 で得られた化合物 (C 6) (1.0 mg, 0.53  $\mu\text{mol}$ ) とウシ血清アルブミン 1 mg を HEPES 緩衝溶液 (50 mM, pH 5.0) 50  $\mu\text{l}$  に溶解させ、 $\alpha$ -マンノシダーゼ (シグマアルドリッチ社製、from Jack Beans) 10  $\mu\text{l}$  (0.9 U) 加えた。この溶液を 37℃ で 20 時間静置した後、メンブランフィルターでろ過を行った。ろ液を HPLC (ODS カラム、2.0  $\phi$  × 25 cm、展開溶媒は 50 mM 酢酸アンモニウム水溶液 : アセトニトリル = 80 : 20、流速 7.5 ml/min) で精製した後、溶媒を濃縮、  
 15 次いで凍結乾燥を行った。残留物を水 200  $\mu\text{l}$  に溶解させ ODS-カラムクロマトグラフィー (コスモシール 75 C<sub>18</sub>-open、最初に水で洗浄を行い、次いで 25% アセトニトリル水溶液で溶出させる) を用いて脱塩処理を行ったところ、目的とする化合物 (C 7) が 0.5  $\mu\text{g}$  得られた。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD = 4.81)

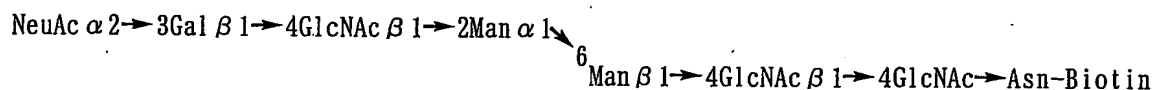
20  $\delta$  8.01 (d, 2H, J = 7.6, Fmoc), 7.81 (d, 2H, J = 7.6, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J = 7.2, Fmoc), 7.53 (d, 2H, J = 7.6, Fmoc), 5.09 (d, 1H, J = 9.2, GlcNAc)



c 1-H 1), 5.01 (s, 1H, Man 4' -H-1), 4.84 (s, 1H),  
 4.55-4.70 (m, 5H), 4.44 (t, 1H, J=6.0, Fmoc),  
 4.30-4.38 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 4.17 (s,  
 1H), 2.80-2.95 (m, 2H, Asn-βCH, NeuAc 7-H 3 e  
 5 q), 2.55-2.70 (m, 1H, Asn-βCH), 2.16, 2.13,  
 2.12 (each s, Ac x 3), 1.98 (s, 3H, Ac) 1.89 (dd,  
 1H, J a=12.2, J b=12.3, NeuAc 7-H 3 a x).



得られた (C 7) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護し  
 10 て糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例  
 1 と同様にビオチン化を行った。



### 実施例 3 3

Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ (α 2, 6) (α  
 15 2, 3) 糖鎖アスパラギンの合成

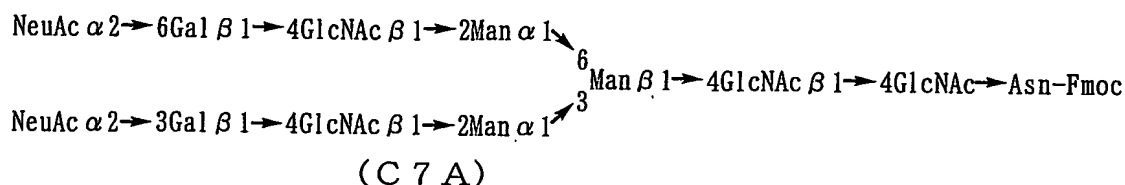
参考例 4 5 で得られた Fmoc 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したモノ  
 シアロ糖鎖アスパラギン (化合物 2) にシアル酸転移酵素を用いて CMP-シ  
 アル酸を転移させた。

シアル酸転移酵素として α 2, 3 転移酵素である市販の Rat, Recomb  
 20 inant 由来のものを用いた。

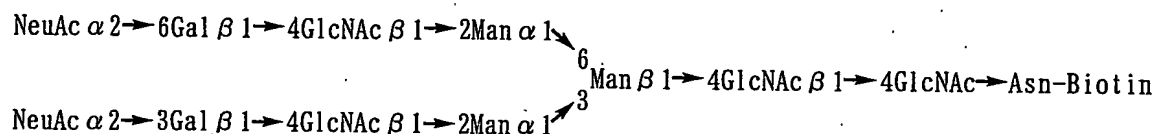
参考例 4 5 で得られた化合物 2 (1.7 mg, 0.75 μmol) を 50 mM カ  
 コジル酸緩衝液 (pH=5.0, 85 μl) に溶解させた後、牛血清アルブミン  
 (BSA, 1 mg) を加える。これに、CMP-シアル酸 (4.8 mg, 7.5 μ

mol), Alkaline phosphatase (1  $\mu$ l, 75 unit) を加え均一化する。最後に、 $\alpha$ 2,3-Sialyltransferase (CALBIOCHEM社製、75  $\mu$ l, 34 mU) を加え37℃で3.5時間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が消失した時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A, 20 $\times$ 250 mm, AN/25 mM AcONH<sub>4</sub> buffer=18/82, 7.5 ml/min., wavelength; 274 nm) と、25分後に化合物 (C7A) が溶出してきた。分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、化合物 (C7A) が1.3 mg (67.8%) 得られた。化合物のNMRデータは以下のとおりである。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30℃, HOD=4.81)  
 $\delta$  8.00 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.79 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.60 (dd, 2H, J=7.2, Fmoc), 7.52 (d, 2H, J=7.2, Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1), 5.09 (d, 1H, J=8.8, GlcNAc1-H1), 5.03 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.86 (s, 1H), 4.58-4.72 (m, 5H), 4.54 (d, 1H, J=8.0), 4.38-4.48 (m, 2H) 4.34 (bs, 1H), 4.28 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 2.80-2.86 (dd, 1H, J<sub>a</sub>=4.4, J<sub>b</sub>=12.4, NeuAc7-H3eq), 2.73-2.83 (m, dd, 3H, J<sub>a</sub>=4.4, J<sub>b</sub>=12.4, Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.60-2.72 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH), 2.16, 2.15, 2.14, 2.12 (each s, Ac x5), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.89 (dd, 1H, J<sub>a</sub>=12.4, J<sub>b</sub>=12.0, NeuAc7-H3ax), 1.81 (dd, 1H, J<sub>a</sub>=12.4, J<sub>b</sub>=12.0, NeuAc7-H3ax).



得られた (C 7 A) の化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施  
5 例 1 と同様にビオチン化を行った。



#### 実施例 3 4

F m o c 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したジシアロ (  $\alpha 2, 3$  ) (  $\alpha$   
10 2, 6 ) 糖鎖アスパラギンの合成

参考例 4 5 で得られた F m o c 基でアスパラギンのアミノ基窒素を保護したモノシアロ糖鎖アスパラギン ( 化合物 6 ) にシアル酸転移酵素を用いて CMP-シアル酸を転移させた。

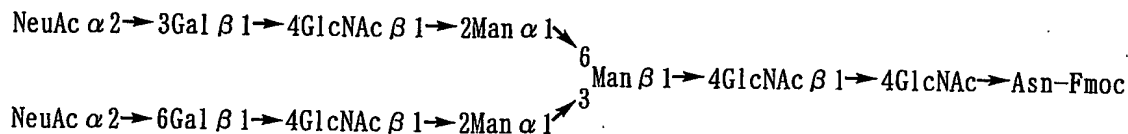
シアル酸転移酵素として  $\alpha 2, 3$  転移酵素である市販の R a t , R e c o m b  
15 i n a n t 由来のものを用いた。

参考例 4 5 で得られた化合物 6 ( 1.2 mg, 0.53  $\mu$ mol ) を 50 mM カ  
コジル酸緩衝液 ( pH = 5.0, 60  $\mu$ l ) に溶解させた後、牛血清アルブミン  
( B S A, 1 mg ) を加える。これに、CMP-シアル酸 ( 3.4 mg, 5.3  $\mu$   
mol )、A l k a l i n e p h o s p h a t a s e ( 1  $\mu$ l, 75 u n i  
20 t ) を加え均一化する。最後に、 $\alpha 2, 3$ -S i a l y l t r a n s f e r a s e  
( C A L B I O C H E M 社製、52.9  $\mu$ l, 24 mU ) を加え 37  $^{\circ}$ C で 3 時

間静置させる。HPLCで反応をモニターしながら原料が全て消費された時点で反応を終了させ、反応液をメンブランフィルターにて濾過する。濾液を濃縮し液量を減じた後、HPLC分取カラムにて精製した (YMC-Pack R&D ODS, D-ODS-5-A,  $2.0 \times 250$  mm, AN/25mM AcONH<sub>4</sub> buffer=18/82, 7.5ml/min., wavelength; 274nm) ところ、23分後に化合物 (C7B) が溶出してきた。分取した後、脱塩処理、次いで凍結乾燥を行うと、各化合物 (C7B) が1.1mg (81.2%) 得られた。各化合物のNMRデータは以下のとおりである。

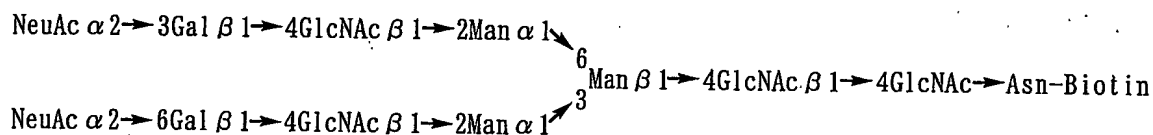
<sup>1</sup>H NMR (400MHz, D<sub>2</sub>O, 30°C, HOD=4.81)

10  $\delta$  8.00 (d, 2H,  $J=7.6$ , Fmoc), 7.79 (d, 2H,  $J=7.6$ , Fmoc), 7.59 (dd, 2H,  $J=7.6$ , Fmoc), 7.51 (dd, 2H,  $J=7.6$ , Fmoc), 5.21 (s, 1H, Man4-H1), 5.08 (d, 1H,  $J=10.0$ , GlcNAc1-H1), 5.00 (s, 1H, Man4'-H-1), 4.84 (s, 1H), 4.60-4.72 (m, 5H),  
15 4.52 (d, 1H,  $J=7.6$ ), 4.35-4.45 (m, 2H), 4.33 (bs, 1H), 4.27 (bs, 1H), 4.15-4.25 (m, 2H), 2.80-2.86 (dd, 1H,  $J_a=4.8$ ,  $J_b=12.4$ , NeuAc7-H3eq), 2.73-2.83 (bs, dd, 3H,  $J_a=4.8$ ,  $J_b=12.4$ , Asn- $\beta$ CH, NeuAc7-H3eq), 2.60-2.72 (m, 1H, Asn- $\beta$ CH),  
20 2.15, 2.12, 2.10 (each s, Ac x5), 1.97 (s, 3H, Ac), 1.88 (dd, 1H,  $J_a=12.4$ ,  $J_b=12.4$ , NeuAc7-H3ax), 1.80 (dd, 1H,  $J_a=12.4$ ,  $J_b=12.4$ , NeuAc7-H3ax).



(C 7 B)

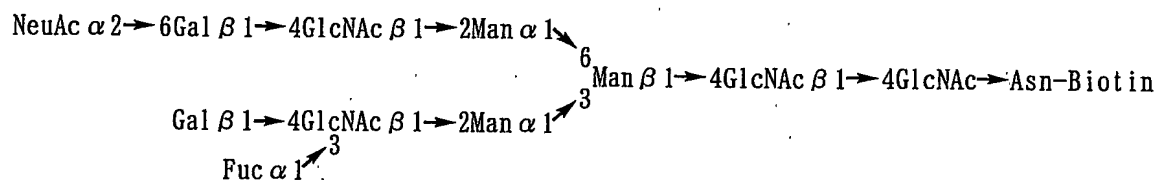
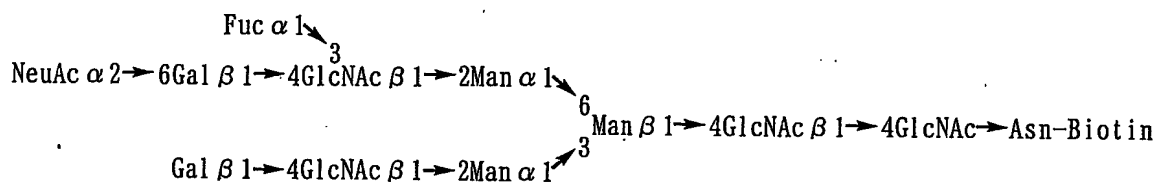
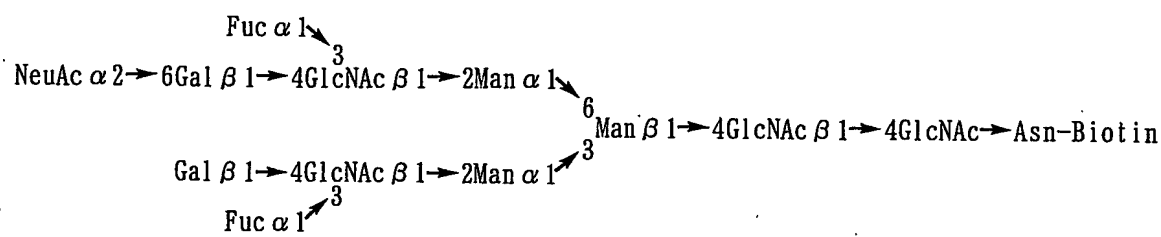
得られた (C 7 B) の化合物を参考例 7 と同様に処理して Fmoc 基を脱保護  
 5 して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施  
 例 1 と同様にビオチン化を行った。



### 実施例 35 ~ 52

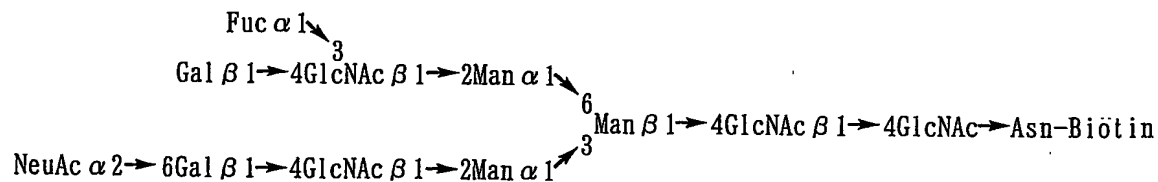
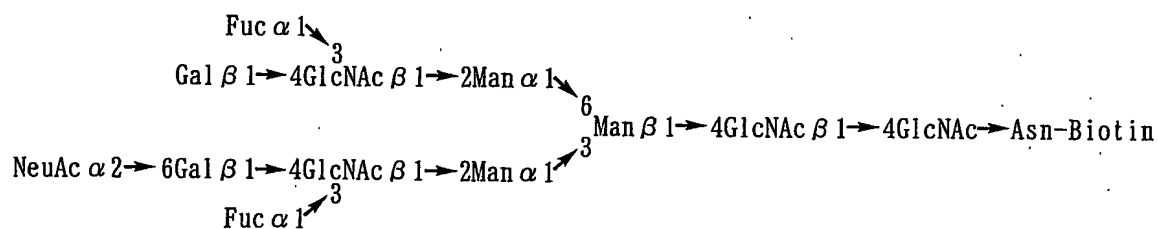
10 参考例 2、8 ~ 10、12、14、17、45、実施例 26 ~ 32 で製造した  
 各 Fmoc-糖鎖アスパラギン 2 nmol を、トリス塩酸緩衝液 約 10 ml  
 に溶解させた。このものに、GDP-フコース 200 nmol、  
 Fucosyltransferase V (Human, Recombinant) 0.5 mU を加え、37℃で約 2  
 時間静置、反応させた。反応液を超純水 20 ml で希釈したのち、キャピラリー  
 15 電気泳動 (fused silica capillary, 50 mm i. d., 60 cm, buffer; 1  
 00 mM Tris-borate, pH=8.3, 100 mM Heptane sulfonate, 印加電  
 圧 27 kV, 温度 25℃, 214 mm) で分離を行いフコースを含む糖鎖アスパ  
 ラギン誘導体を得た。得られた上記糖鎖アスパラギン誘導体を参考例 7 と同様に  
 20 処理して Fmoc 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパ  
 ラギンを使用した以外は実施例 1 と同様にビオチン化を行った。得られたビオチ  
 ン化糖鎖アスパラギンを以下に示す。

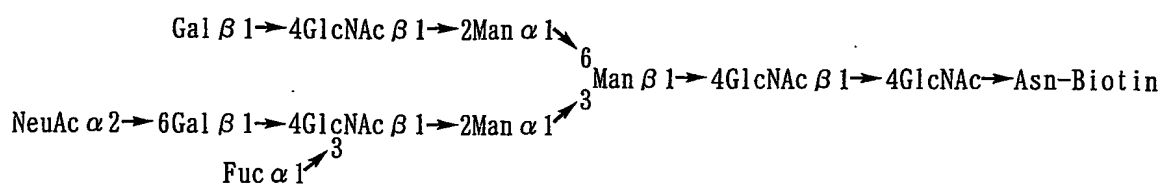
## 実施例 3 5



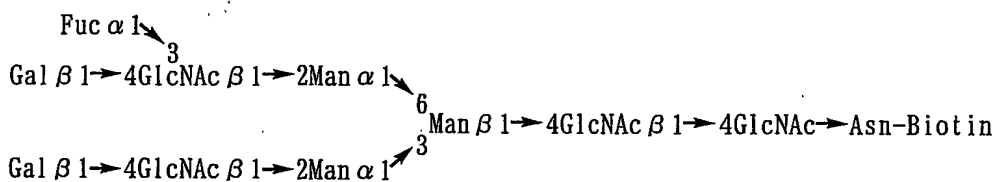
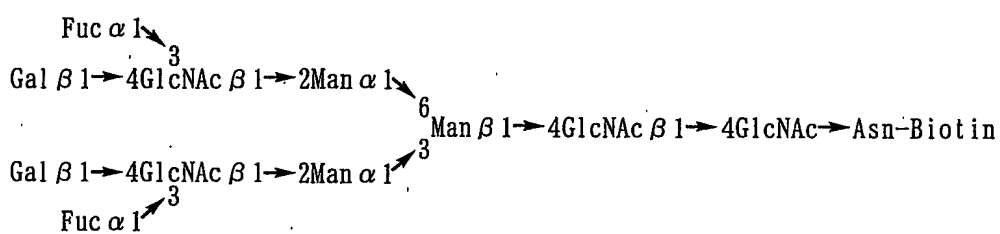
5

## 実施例 3 6

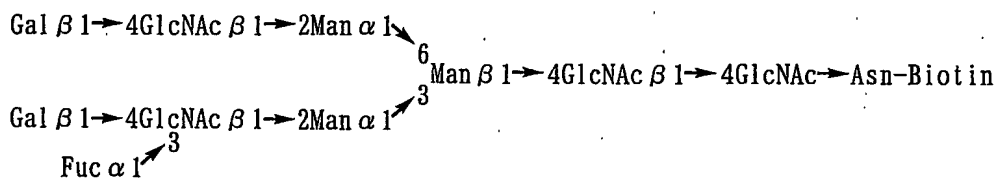




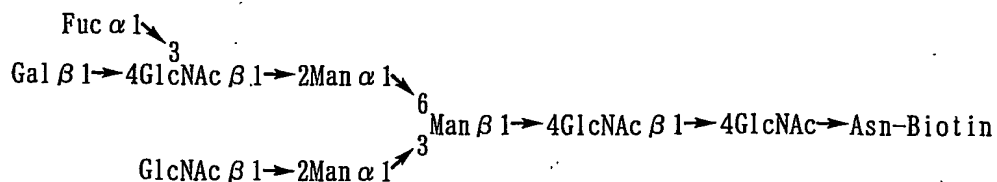
### 实施例 37



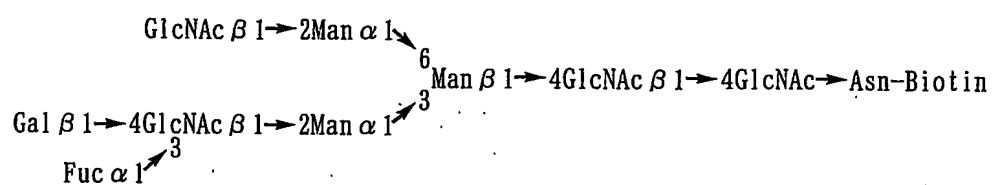
5



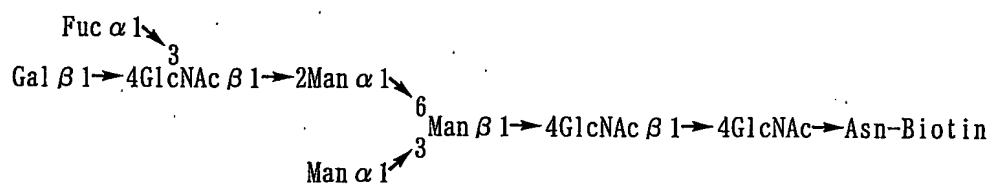
### 实施例 38



## 実施例 3 9

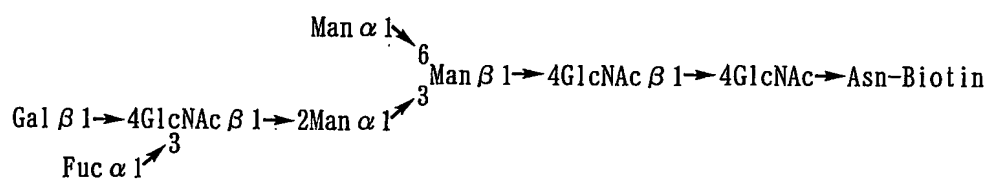


## 実施例 4 0

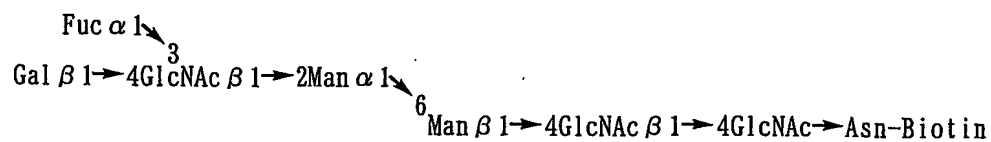


5

## 実施例 4 1



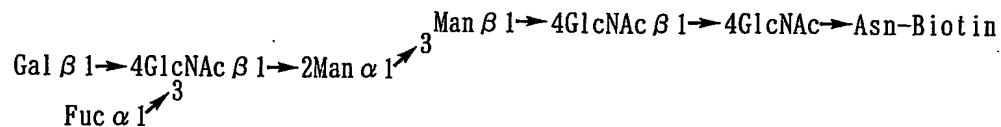
## 10 実施例 4 2



15

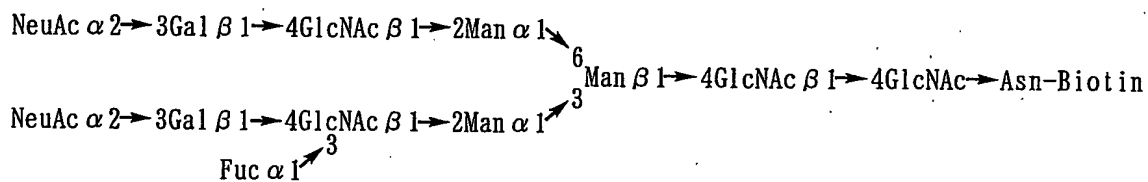
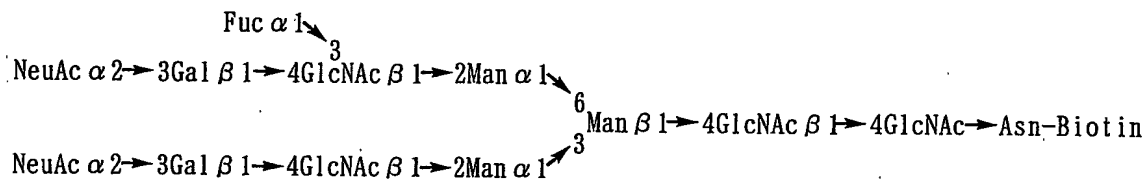
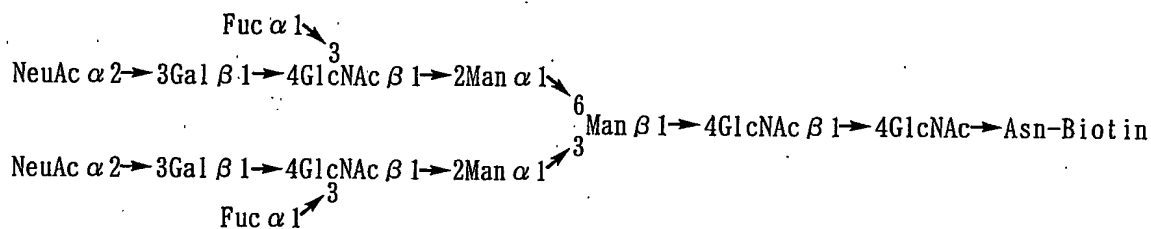


## 実施例 4 3

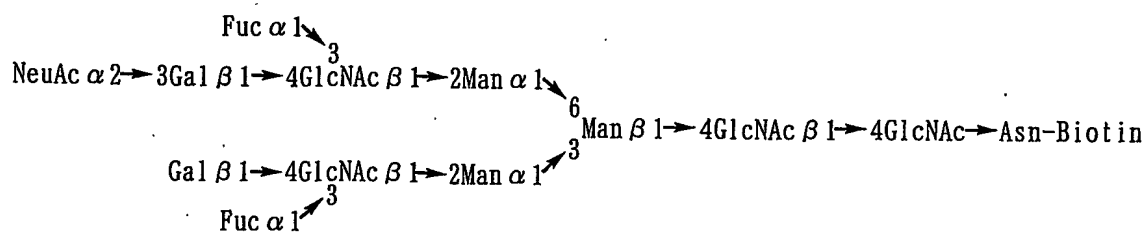


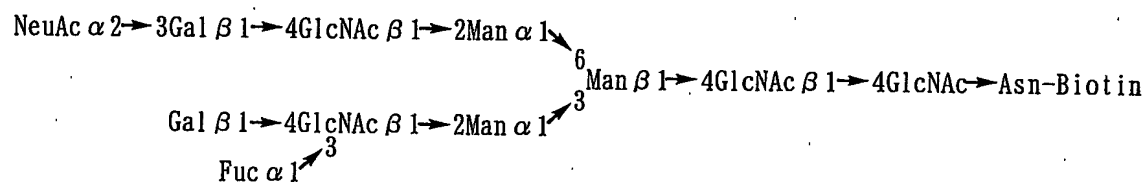
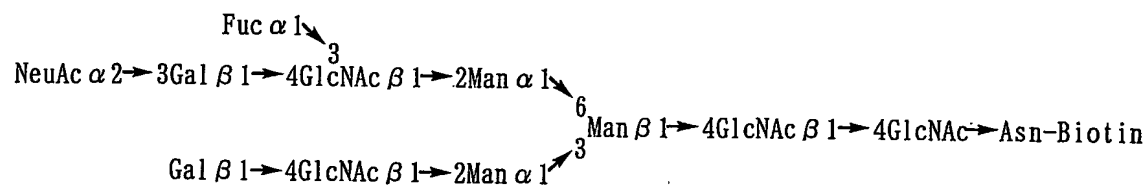
## 実施例 4 4

5



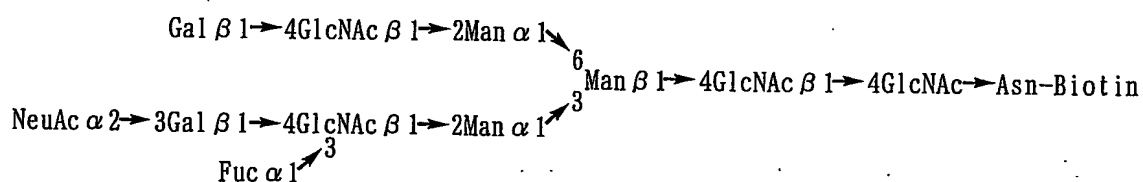
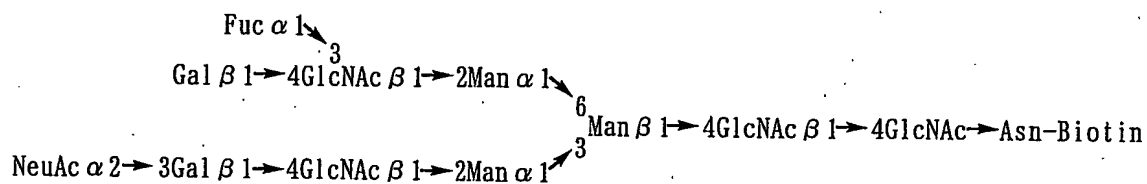
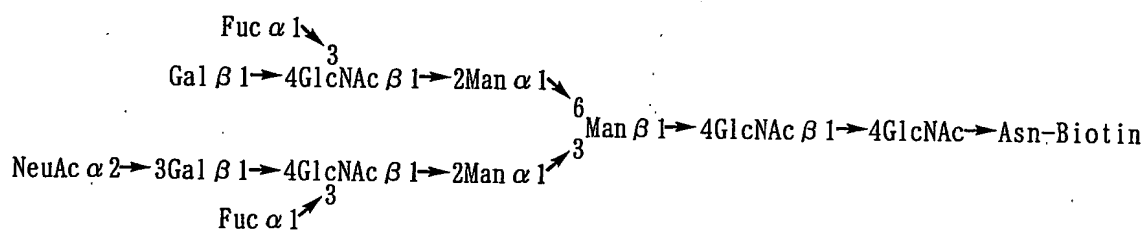
## 10 実施例 4 5



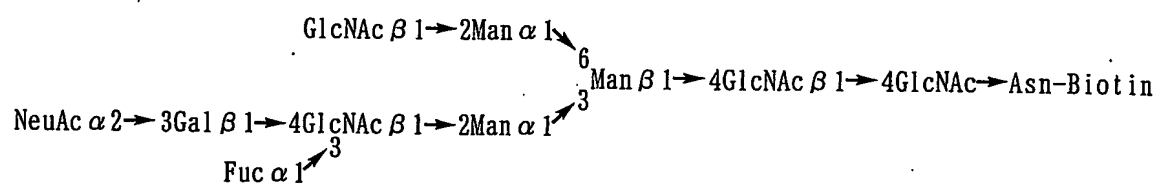


## 実施例 4 6

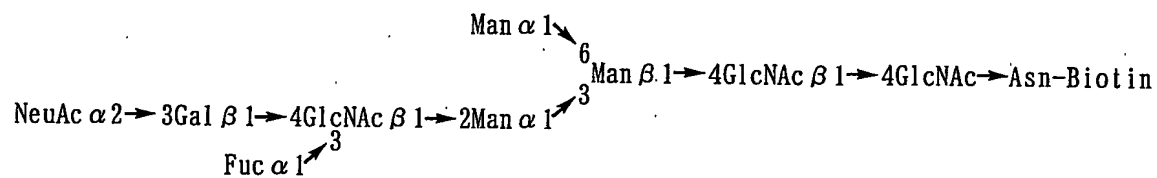
5



## 実施例 4 7

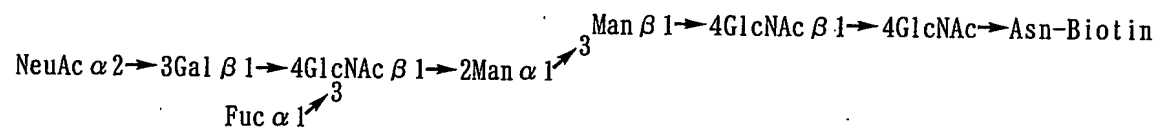


## 実施例 4 8

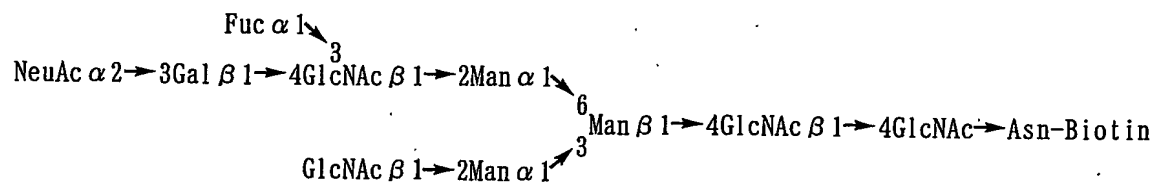


5

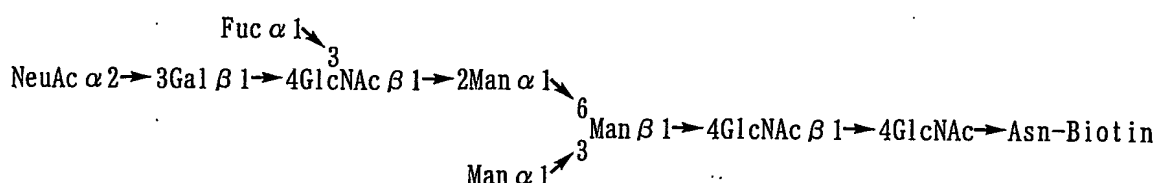
## 実施例 4 9



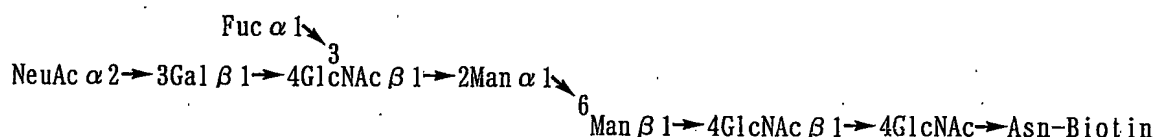
## 10 実施例 5 0



## 実施例 5 1



## 実施例 5 2

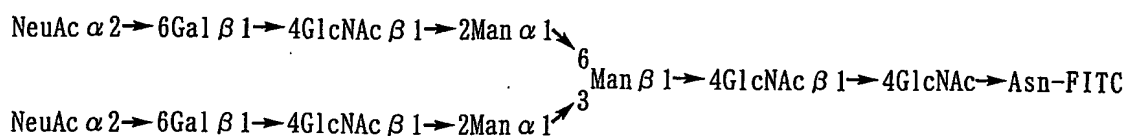


5

## 実施例 5 3

ジシアロ糖鎖アスパラギン（化合物 2 4）（11 糖、1.4 mg、0.60 mmol）を、精製水 70 ml に溶解させた。このものにアセトン 70 ml、NaHCO<sub>3</sub>（0.76 mg、9 mmol）を加え、室温下に攪拌した後、

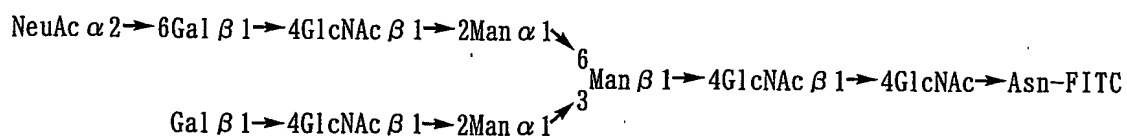
- 10 Fluorescein isothiocyanate（FITC，0.95 mg，2.4 mmol，Aldrich 社製）を加え約 2 時間攪拌した。2 時間後、TLC にて反応の終了を確認した後、アセトンを減圧下に留去させ、残った水溶液をゲルカラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25，H<sub>2</sub>O）にて精製し目的物の含まれる分画を集めた。集めた分画を濃縮後、HPLC（YMC-Pack ODS=
- 15 AM，SH-343-5 AM，20×250 mm，AN/25 mM AcONH<sub>4</sub> buffer=10/90，7.5 ml/min.，wavelength；274 nm）で分取した後、ゲルカラムクロマトグラフィー（Sephadex G-25，H<sub>2</sub>O）にて脱塩処理を行った。目的物の含まれる分画を集め、濃縮後、凍結乾燥を行うと目的とする FITC 化されたジシアロ糖鎖誘導体（1.
- 20 2 mg，73.5% yield）が得られた。

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30°C, HOD=4.81)

$\delta$  7.86 (d, 1H,  $J=2.0$ , FITC), 7.75 (dd, 1H,  $J_a=$   
8.0,  $J_b=2.0$ , FITC), 7.46 (d, 1H,  $J=8.0$ , FITC),  
5 7.41 (d, 1H,  $J=9.6$ , FITC), 6.71–6.83 (bm, 4H,  
FITC), 5.22 (s, 1H, Man4–H1), 5.10–5.20 (bm,  
2H, GlcNAc1–H1), 5.03 (s, 1H, Man4'–H–1),  
4.70–4.80 (m, 3H), 4.53 (d, 2H,  $J=8.0$ ), 4.33 (s,  
1H, Man3–H–2), 4.27 (bs, 1H, Man4–H–2), 4.18  
10 (s, 1H, Man4–H–2), 2.90–3.00 (m, 1H, Asn– $\beta$ C  
H), 2.85–2.95 (m, 1H, Asn– $\beta$ CH), 2.75 (dd, 2H,  
 $J_a=12.0$ ,  $J_b=2.8$ , NeuAc7–H3ex), 2.15, 2.14,  
2.12, 2.09 (each s, 18H, Acx6), 1.80 (dd, 2H,  
 $J_a=12.0$ ,  $J_b=12.0$ , NeuAc7–H3ax).

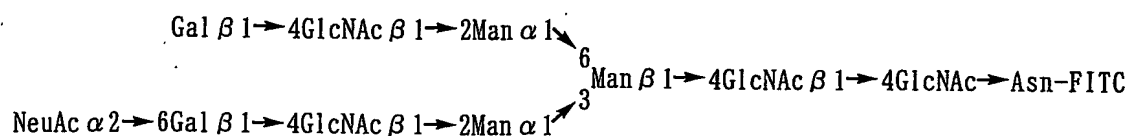
## 15 实施例 54

化合物 24 の代わりに、化合物 76 を用いて実施例 53 と同様にして F I T C 化を行った。



## 20 实施例 55

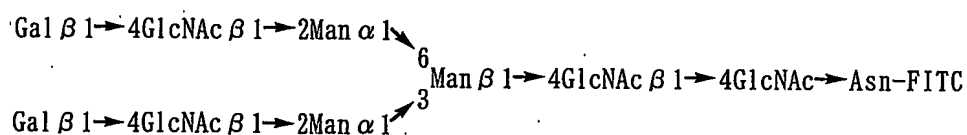
化合物 24 の代わりに、化合物 77 を用いて実施例 53 と同様にして F I T C 化を行った。



### 実施例 5 6

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 3 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

5



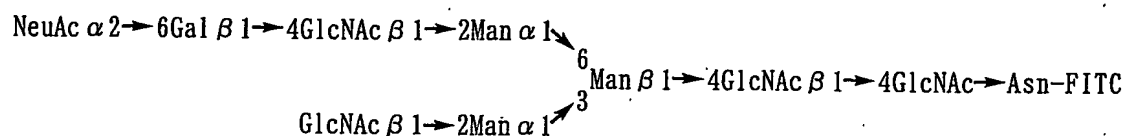
得られた F I T C 化糖鎖アスパラギンの NMR データを以下に示す。

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, D<sub>2</sub>O, 30°C, HOD=4.81)

$\delta$  7.88 (d, 1H,  $J=2.0$ , FITC), 7.76 (dd, 1H,  $J_a=$   
 10 8.0,  $J_b=2.0$ , FITC), 7.46 (d, 1H,  $J=8.0$ , FITC),  
 7.45 (d, 1H,  $J=8.8$ , FITC), 6.85–6.93 (m, 4H,  
 FITC), 5.21 (s, 1H, Man 4–H1), 5.05–5.20 (bd,  
 2H, GlcNAc 1–H1), 5.01 (s, 1H, Man 4'–H–1),  
 4.67 (d, 3H,  $J=7.6$ ), 4.55 (d, 2H), 4.34 (s, 1H,  
 15 Man 3–H–2), 4.28 (bs, 1H, Man 4–H–2), 4.20 (s,  
 1H, Man 4–H–2), 3.00–3.10 (bm, 1H, Asn– $\beta$ CH),  
 2.90–3.00 (m, 1H, Asn– $\beta$ CH), 2.75 (dd, 2H,  $J_a=$   
 12.0,  $J_b=2.8$ , NeuAc 7–H3ex), 2.14, 2.13, 2.12,  
 2.08 (each s, 12H, Ac x 4).

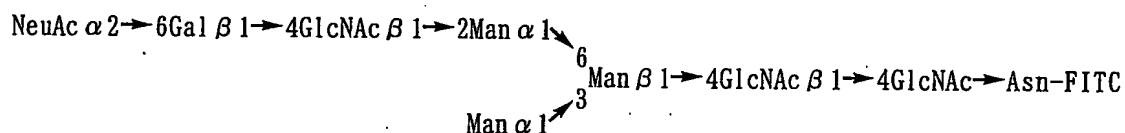
### 20 実施例 5 7

化合物 2 4 の代わりに、化合物 2 6 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



## 実施例 5 8

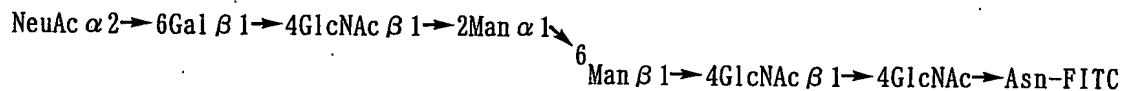
化合物 2 4 の代わりに、化合物 2 7 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



5

## 実施例 5 9

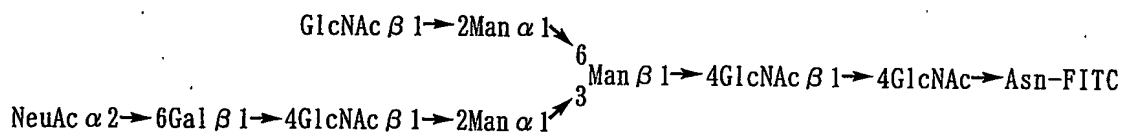
化合物 2 4 の代わりに、化合物 2 8 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



10

## 実施例 6 0

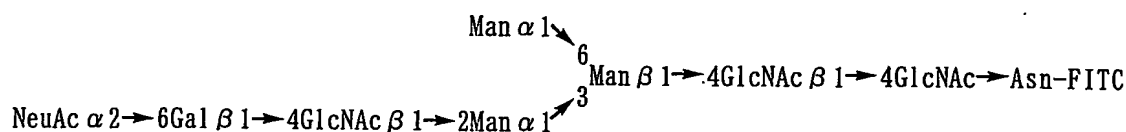
化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 0 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



15

## 実施例 6 1

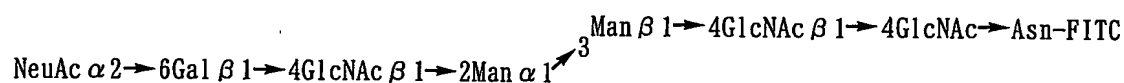
化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 1 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



### 実施例 6 2

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 2 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

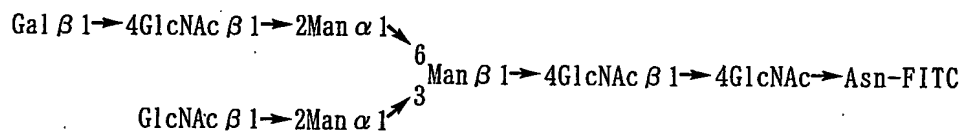
5



### 実施例 6 3

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 7 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

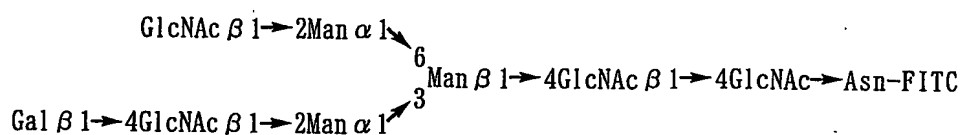
10



### 実施例 6 4

化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 2 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

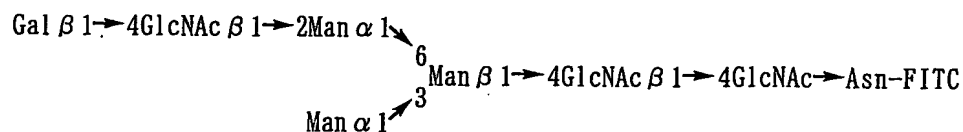
15



### 実施例 6 5

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 8 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

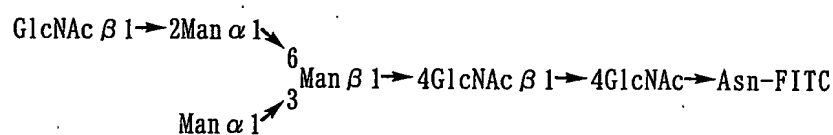




## 実施例 6 6

化合物 2 4 の代わりに、化合物 7 2 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

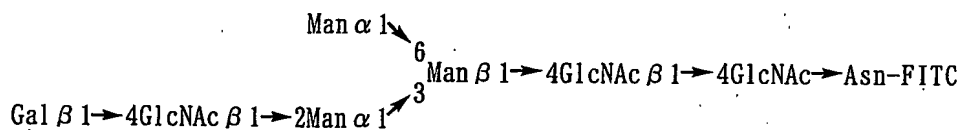
5



## 実施例 6 7

化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 3 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

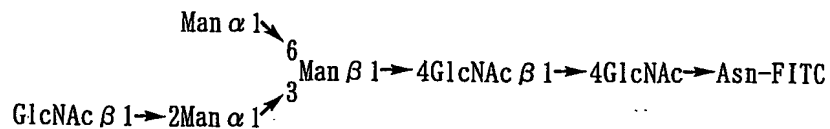
10



## 実施例 6 8

化合物 2 4 の代わりに、化合物 7 3 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。

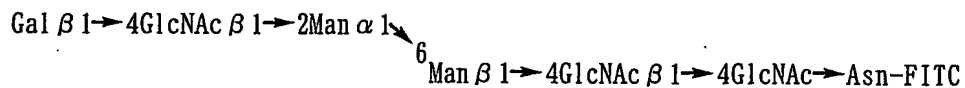
15



## 実施例 6 9

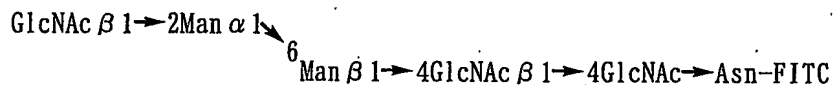
化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 9 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C

化を行った。



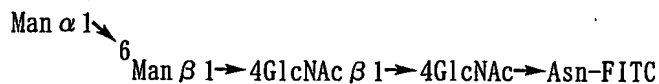
#### 実施例 7 0

- 5 化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 0 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



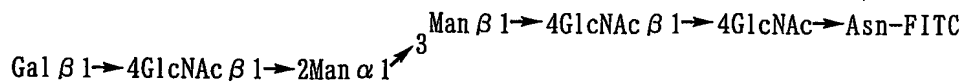
#### 実施例 7 1

- 10 化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 1 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



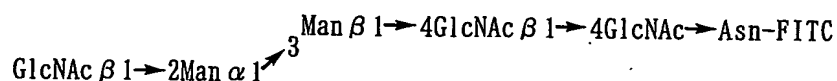
#### 実施例 7 2

- 15 化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 4 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



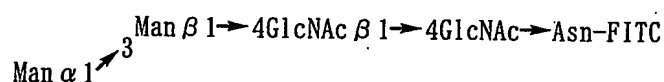
#### 実施例 7 3

化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 5 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



## 実施例 7 4

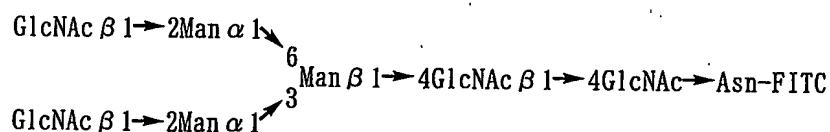
化合物 2 4 の代わりに、化合物 4 6 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



5

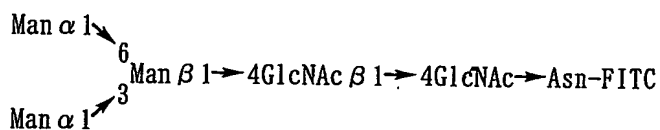
## 実施例 7 5

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 4 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



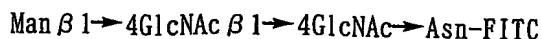
## 10 実施例 7 6

化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 5 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



## 実施例 7 7

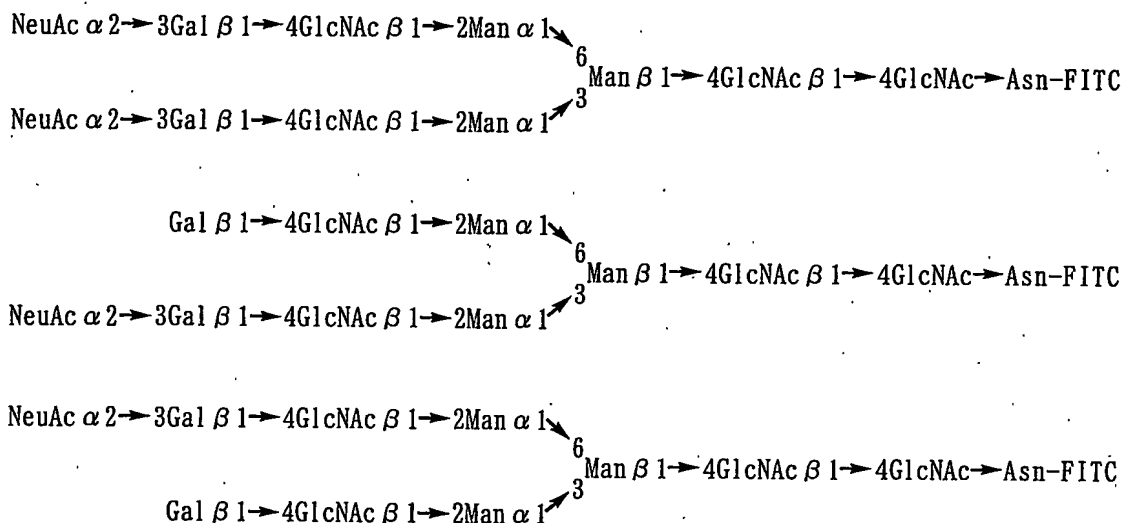
15 化合物 2 4 の代わりに、化合物 3 6 を用いて実施例 5 3 と同様にして F I T C 化を行った。



## 実施例 7 8

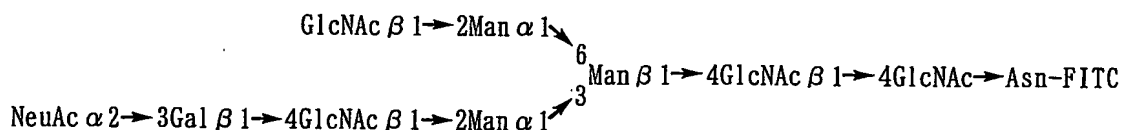
実施例 2 6 で得られた (C-1) ~ (C-3) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。

5



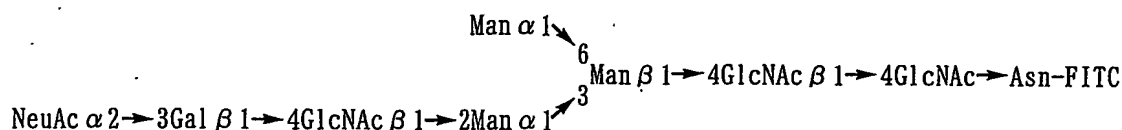
## 実施例 7 9

10 実施例 2 7 で得られた (C 2) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



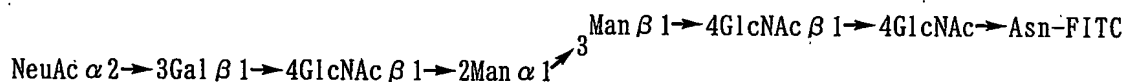
## 15 実施例 8 0

実施例 2 8 で得られた (C 3) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



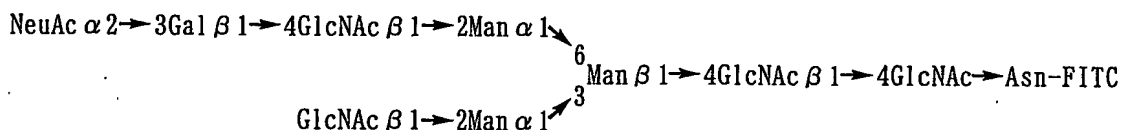
### 実施例 8 1

実施例 2 9 で得られた (C 4) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o  
 5 c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



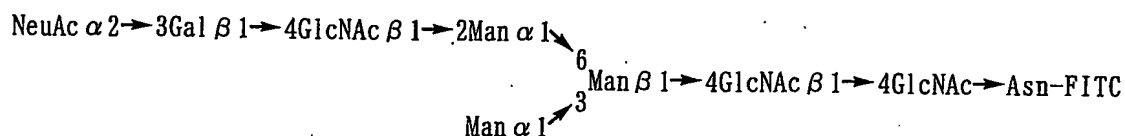
### 実施例 8 2

10 実施例 3 0 で得られた (C 5) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o  
 c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



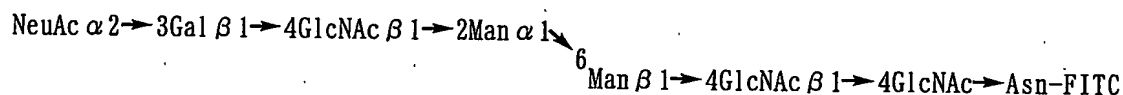
### 15 実施例 8 3

実施例 3 1 で得られた (C 6) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o  
 c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



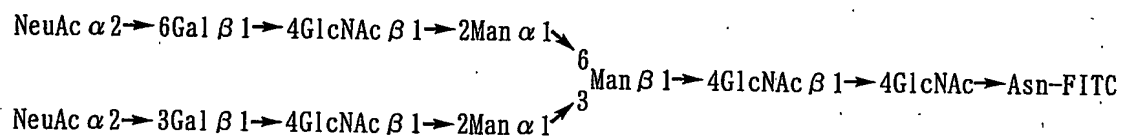
#### 実施例 8 4

実施例 3 2 で得られた (C 7) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m o  
c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用し  
5 た以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



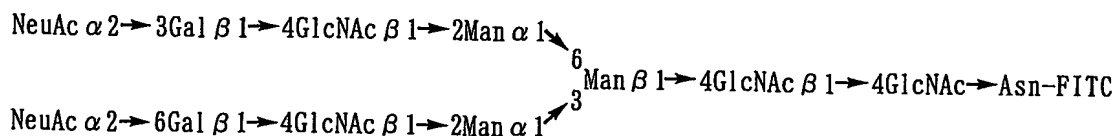
#### 実施例 8 5

実施例 3 3 で得られた (C 7 A) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m  
10 o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用  
した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



#### 実施例 8 6

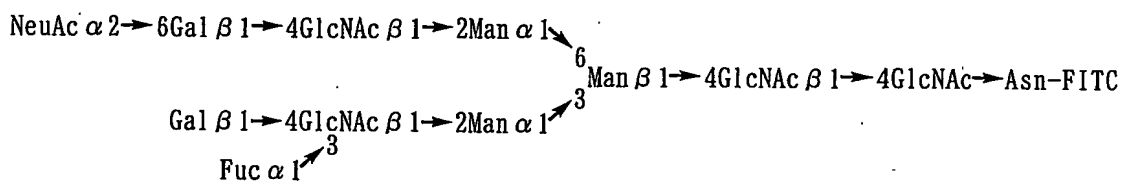
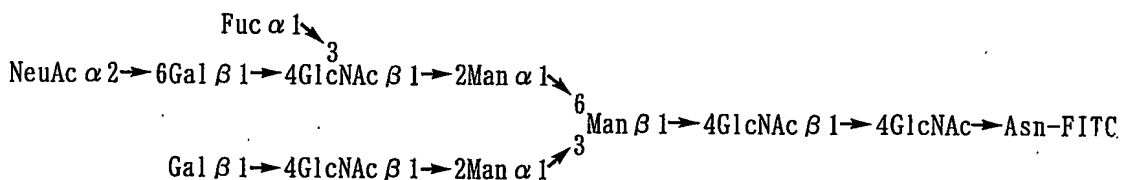
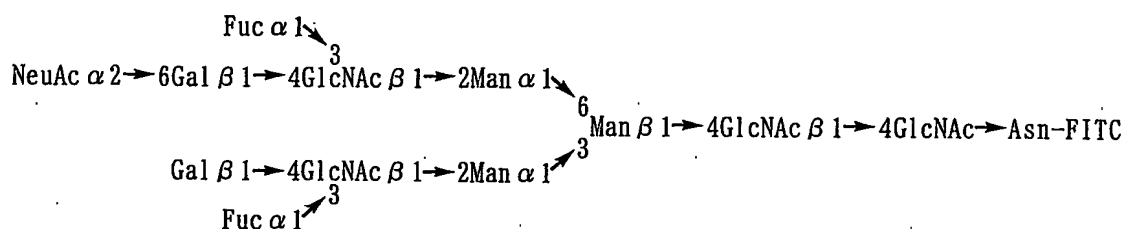
実施例 3 4 で得られた (C 7 B) の各化合物を参考例 7 と同様に処理して F m  
15 o c 基を脱保護して糖鎖アスパラギンを得た。得られた糖鎖アスパラギンを使用  
した以外は実施例 5 3 と同様に F I T C 化を行った。



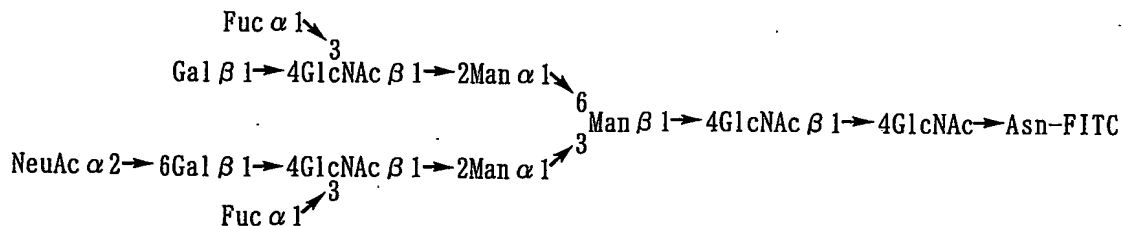
## 実施例 87 ~ 104

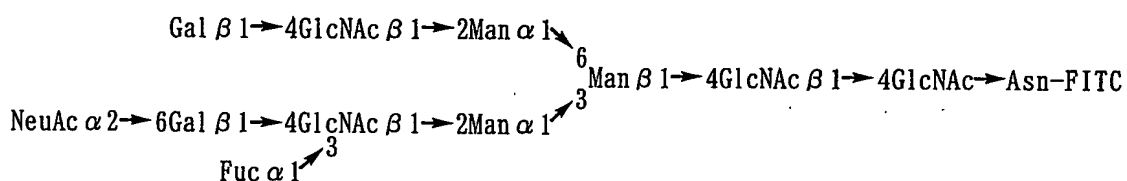
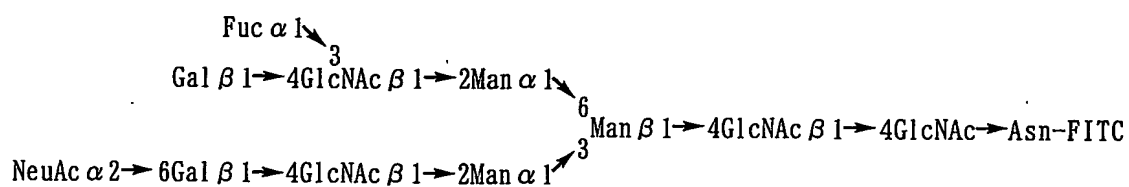
実施例 35 ~ 52 で得られたフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体を用いて実施例 53 と同様にして F I T C 化を行った。

## 5. 実施例 87

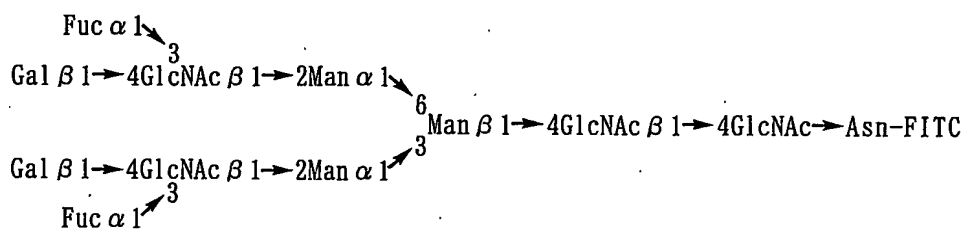


## 10 実施例 88

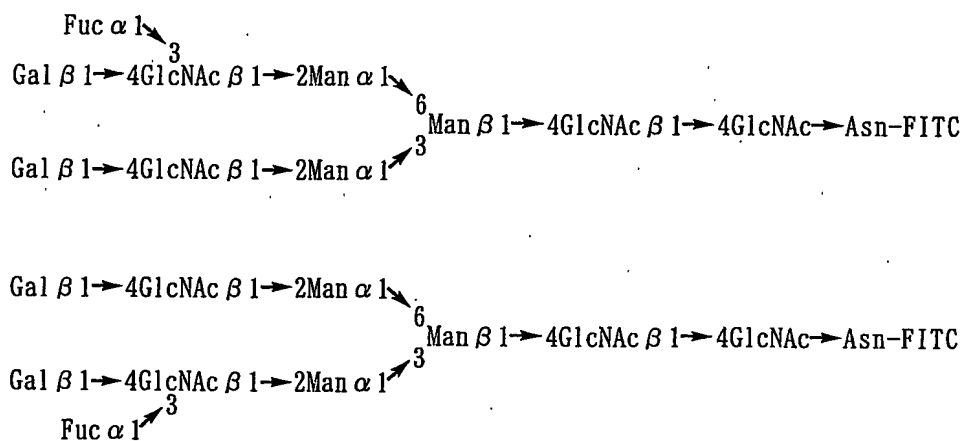




### 実施例 89

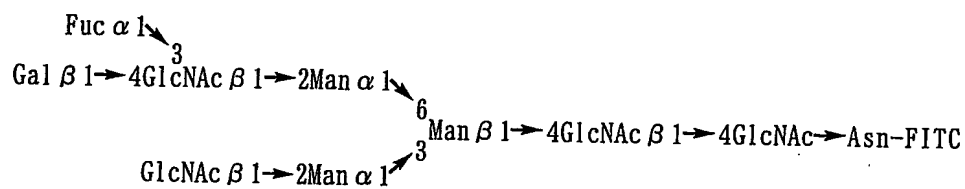


5

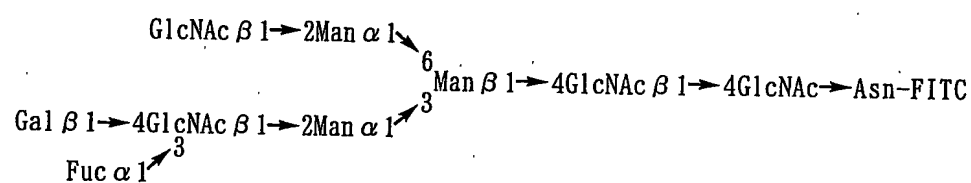




## 実施例 9 0

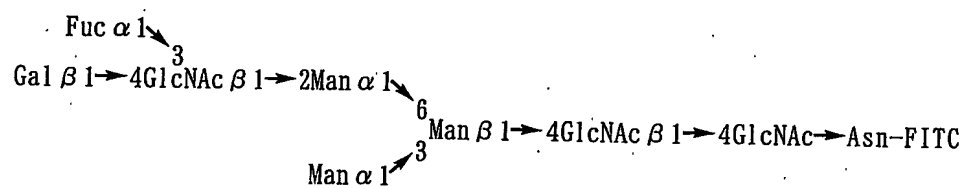


## 実施例 9 1

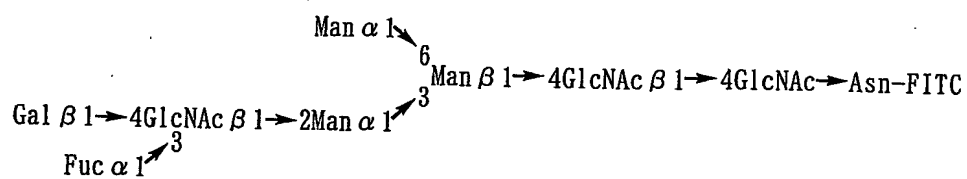


5

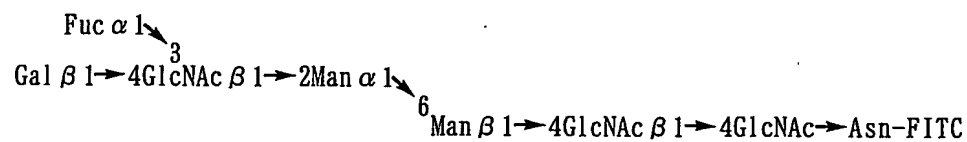
## 実施例 9 2



## 10 実施例 9 3

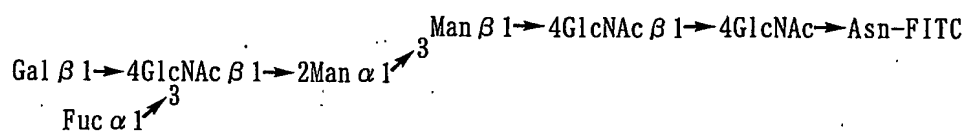


## 実施例 9 4

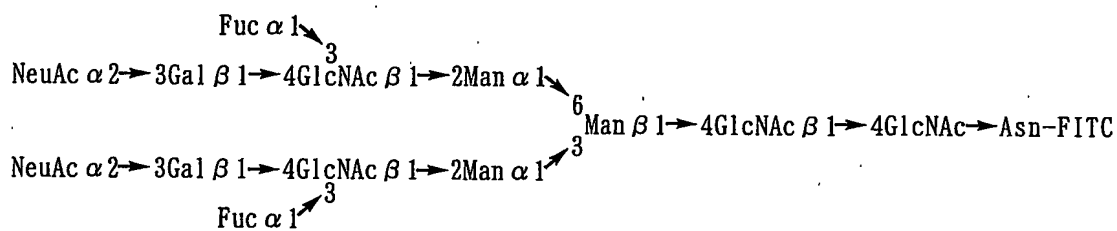


## 実施例 9 5

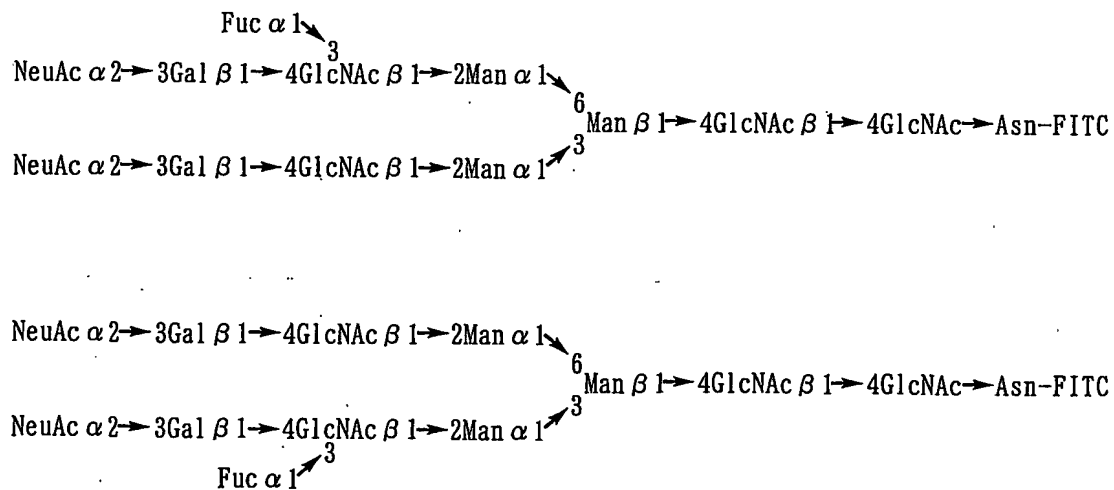
5



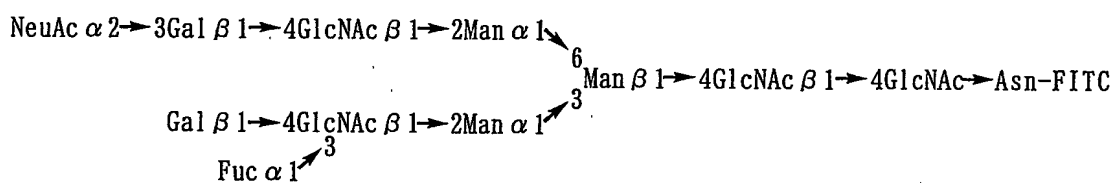
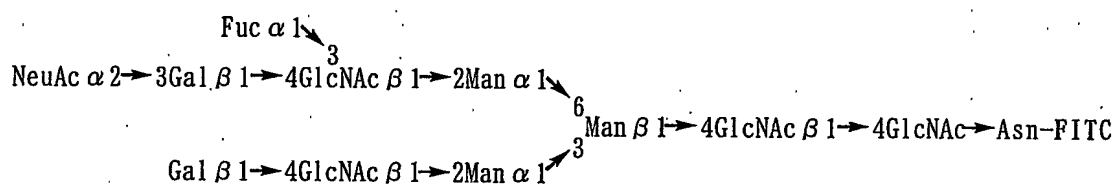
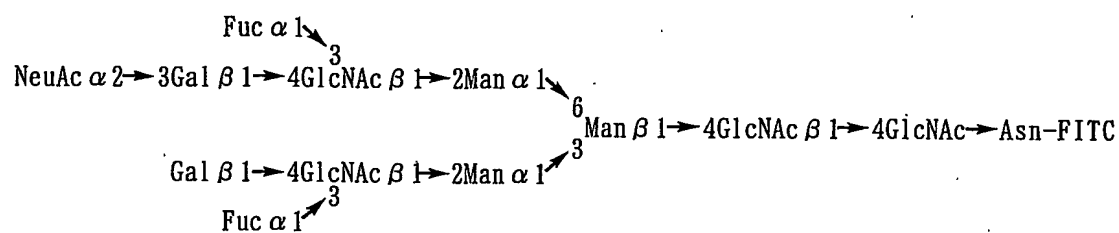
## 実施例 9 6



10

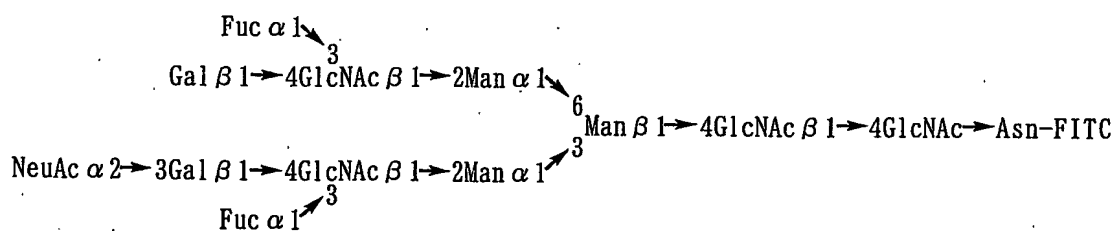


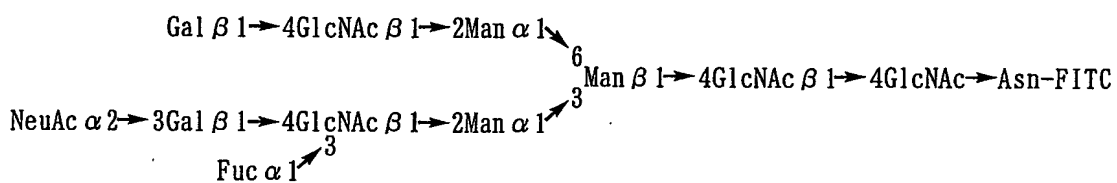
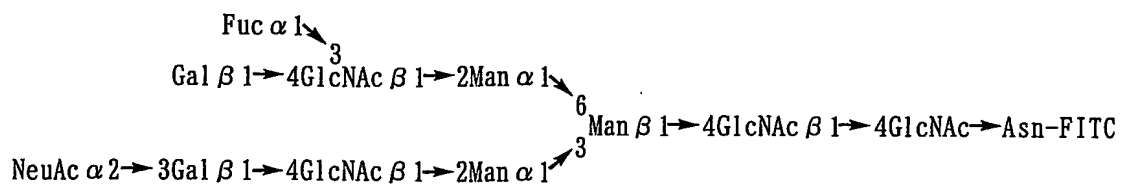
## 実施例 9 7



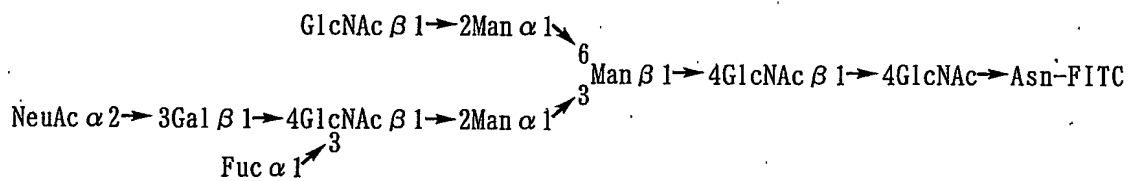
5

## 実施例 9 8



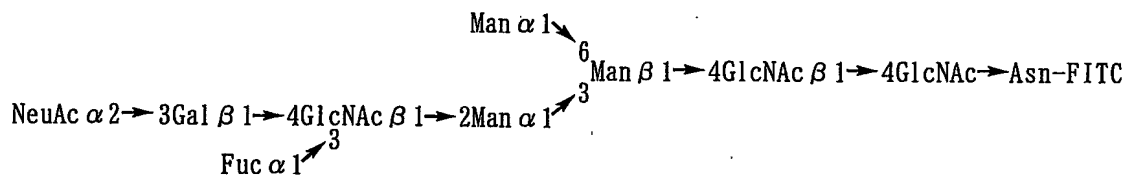


### 実施例 9 9



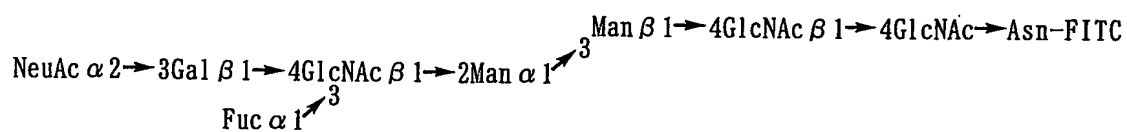
5

### 実施例 1 0 0

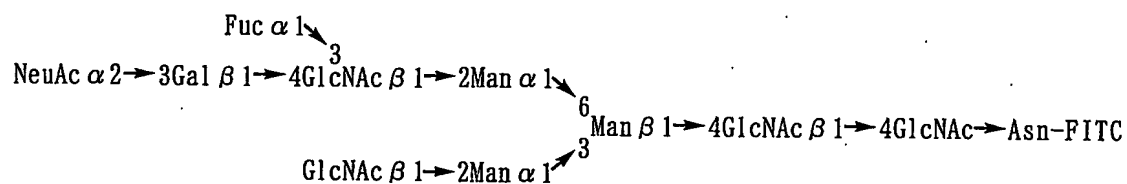


10

### 実施例 1 0 1

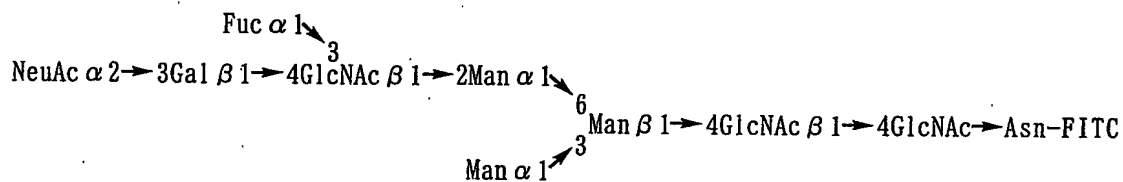


## 実施例 1 0 2



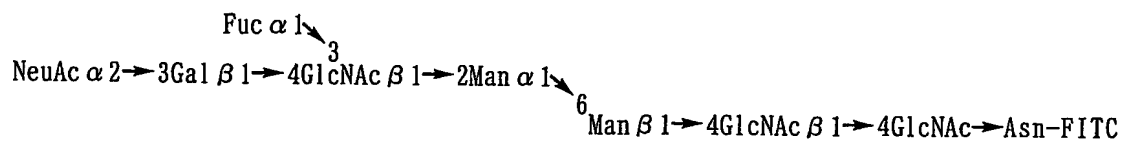
5

## 実施例 1 0 3



10

## 実施例 1 0 4



## 実施例 1 0 5 (マイクロプレートの製造)

- 15 96穴BDバイオコートストレプトアビジン (BDバイオサイエンス社製: バイオアッセイ用、結合能: 5 ng / 1穴) に、実施例 1 のビオチン化糖鎖アスパ

ラギン100 $\mu$ g（ビオチン結合能の約10倍相当量）を蒸留水に溶かし1000 $\mu$ lとした。この調整溶液を1穴当り10 $\mu$ lとなるように各ウェルに加え、蒸留水で3回洗浄し、マイクロプレートを製造した。各ビオチン化糖鎖アスパラギンの結合収率は95%以上であった。固定化率の確認は、洗い出された非固定

5 化糖鎖残量より算出した。

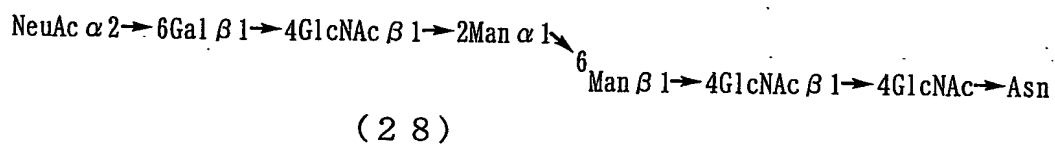
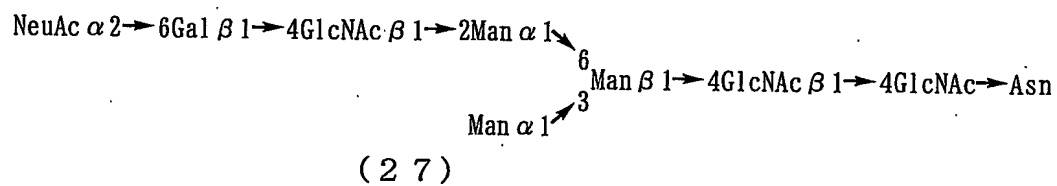
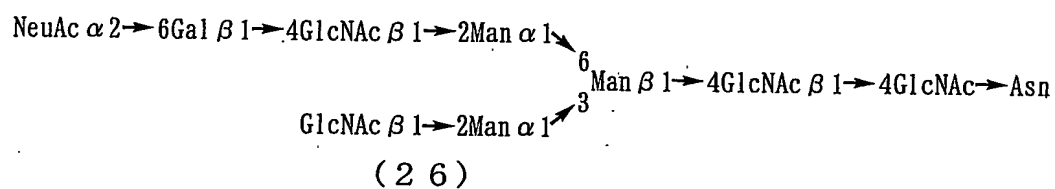
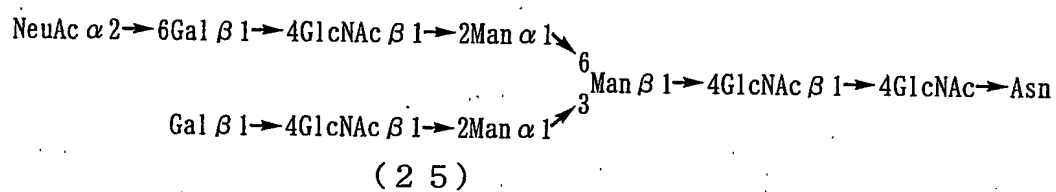
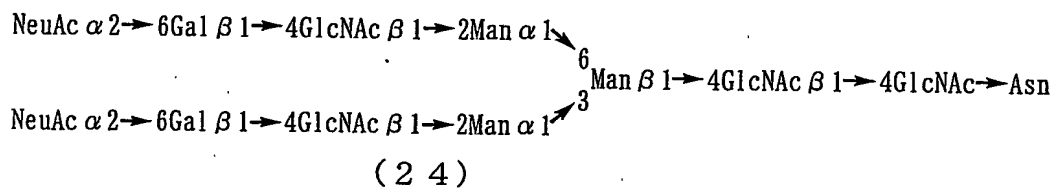
#### 実施例106（アフィニティーカラムの製造）

アビジンコートビーズ（日立ソフトウェアエンジニアリング社製、xMAP LumAvidin Development Microspheres 1ml）10mlと実施例1のビオチン化糖鎖アスパラギン3.0mgをスラリー状態で攪拌し、ビーズをろ過、洗浄した。洗浄は、ビーズ体積の2倍量の蒸留水を使用して、3回ろ紙上で洗浄した。固定化の

10 確認は、洗浄回収されたビオチン化糖鎖アスパラギンの残量により確認した。次に上記のビオチン化糖鎖アスパラギン固定ビーズ10mlを30mlの蒸留水でスラリー状態のまま、ガラス製のオープンクロマトカラム（ $\phi$ 20mm、長さ300mm）に充填し、アフィニティーカラムを製造した。

15

表 1



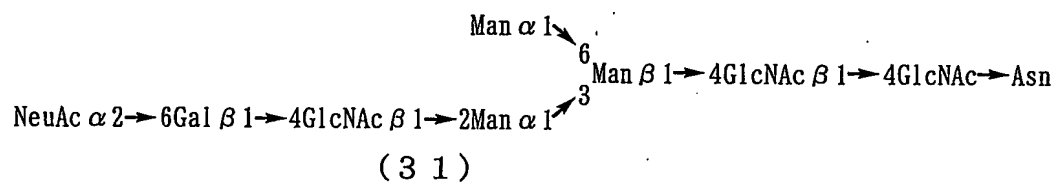
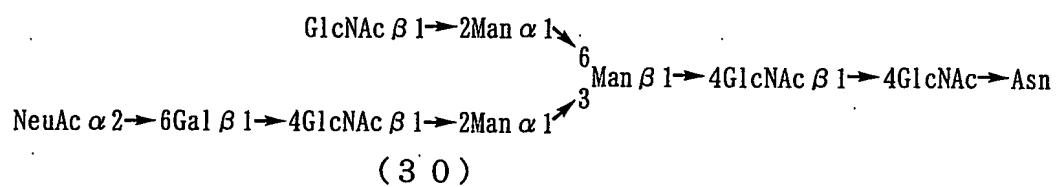
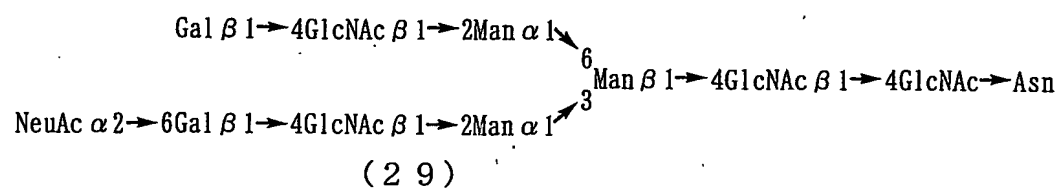
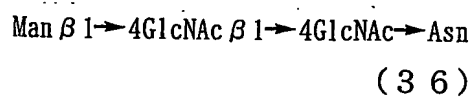
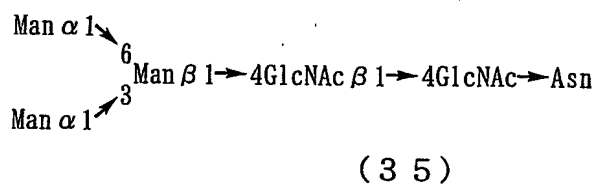
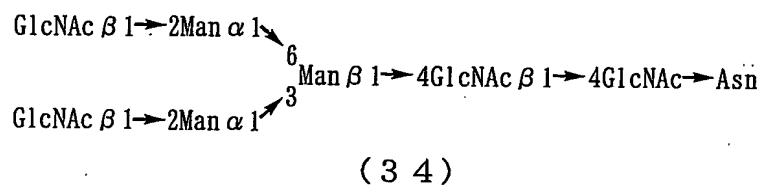
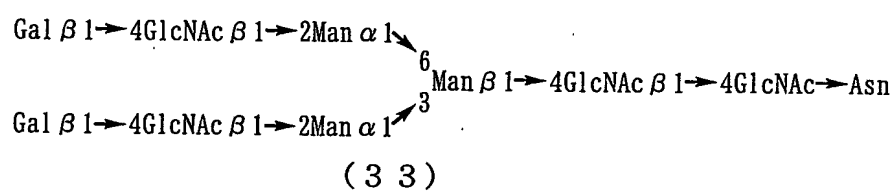
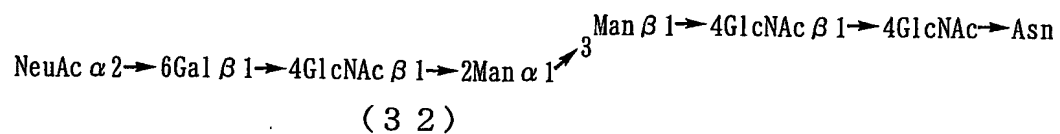




表 2



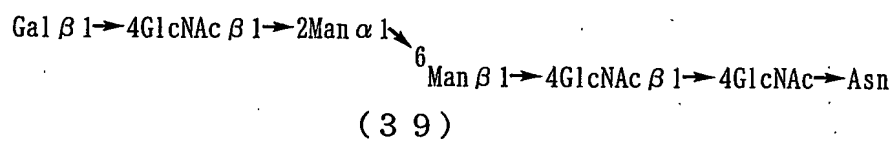
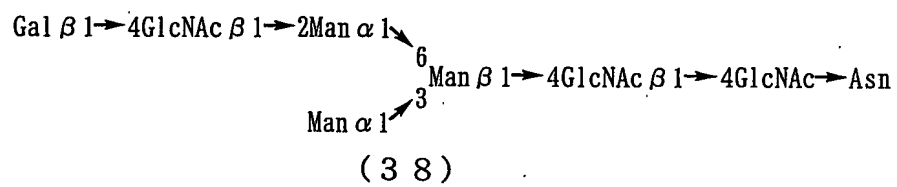
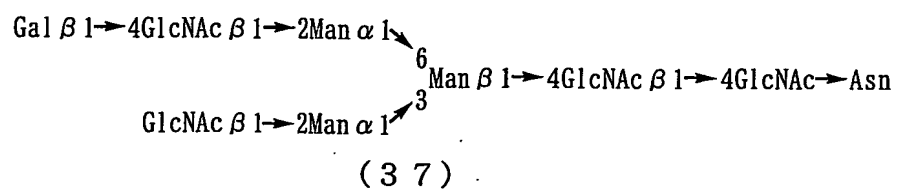
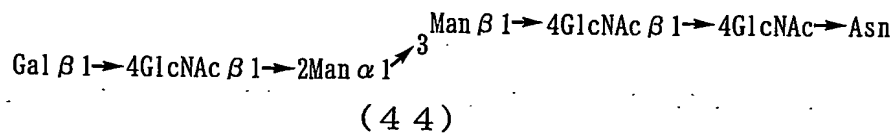
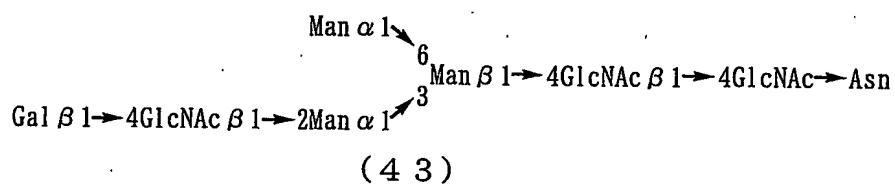
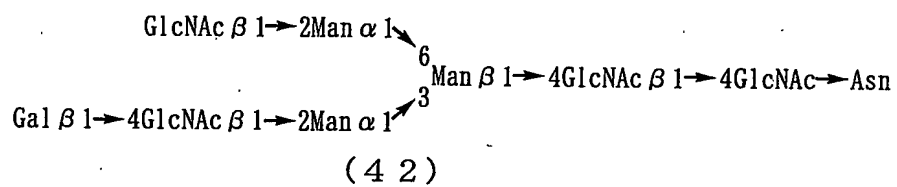
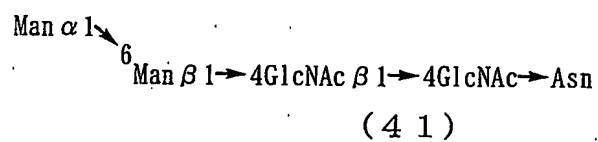
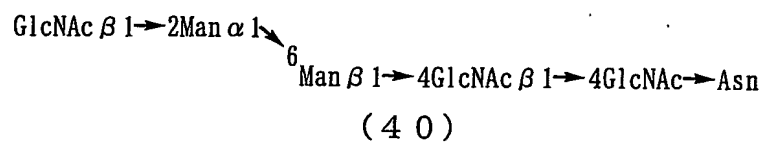
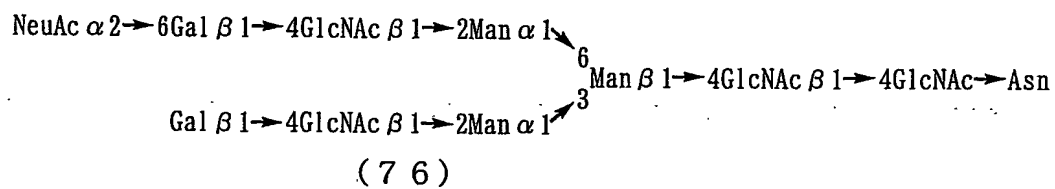
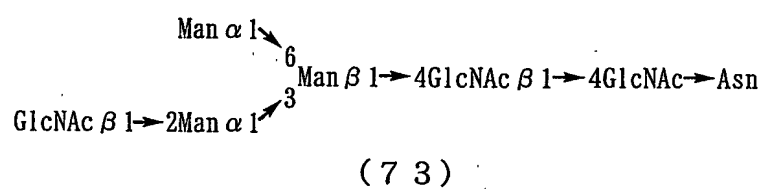
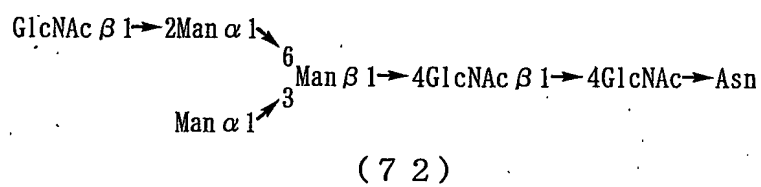
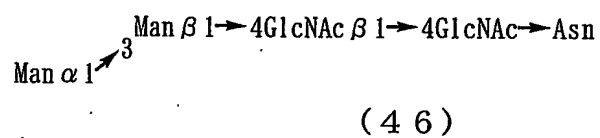
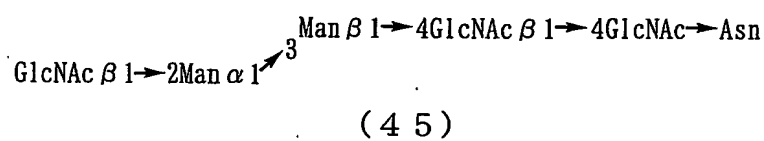
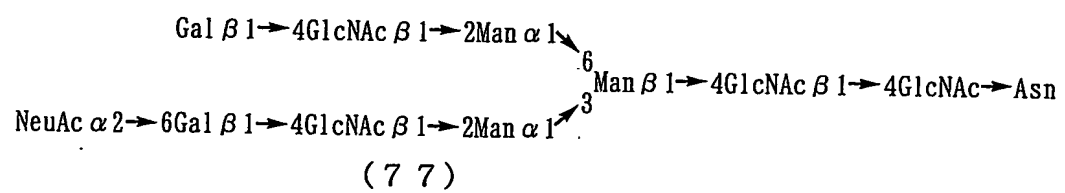


表 3









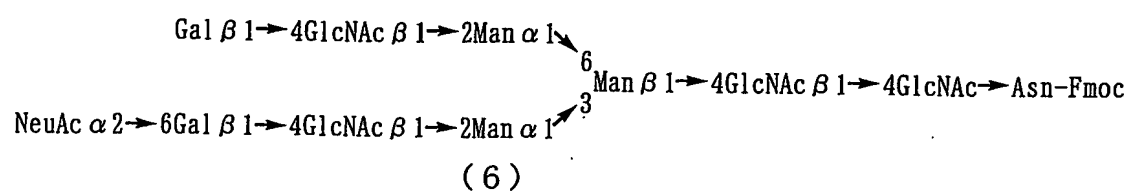
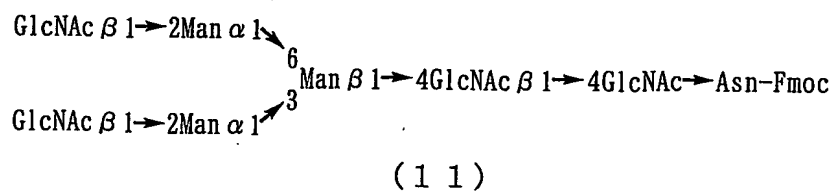
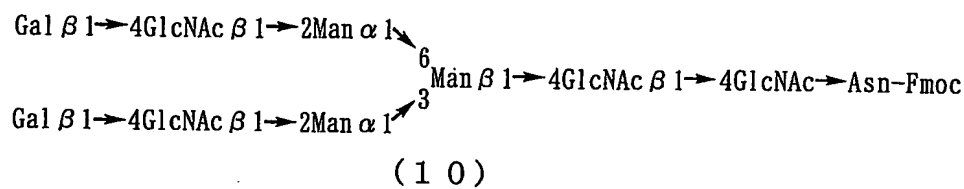
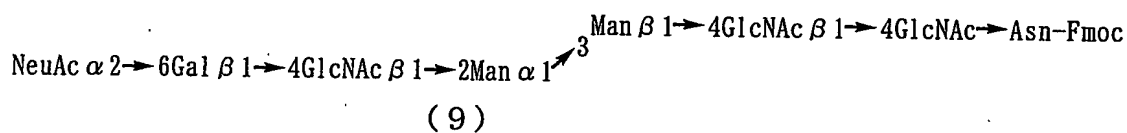
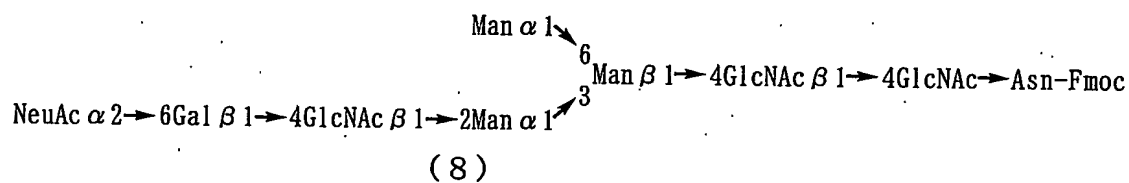
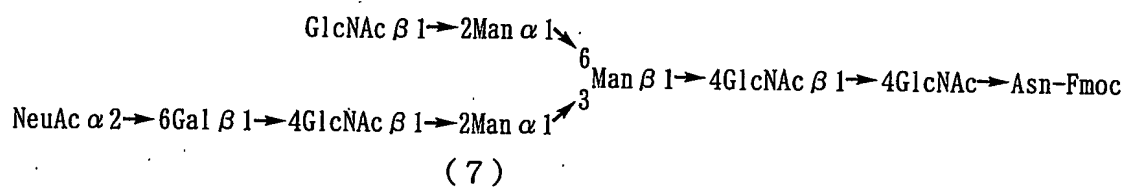
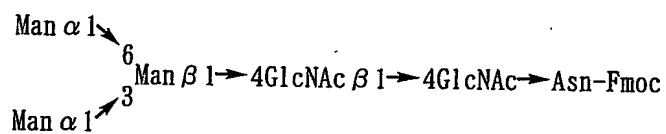


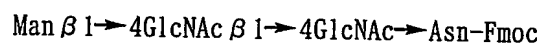
表 5



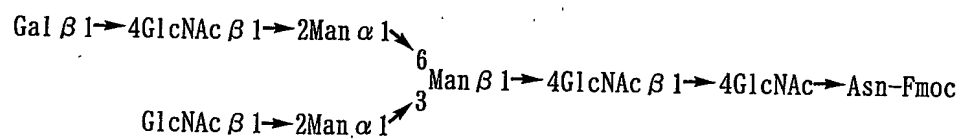




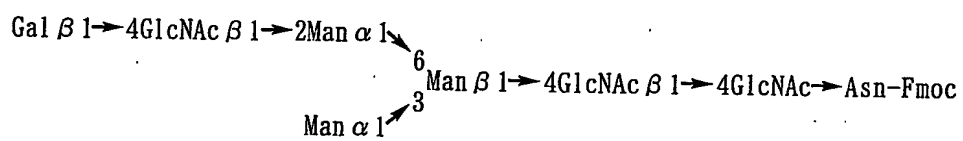
( 1 2 )



( 1 3 )

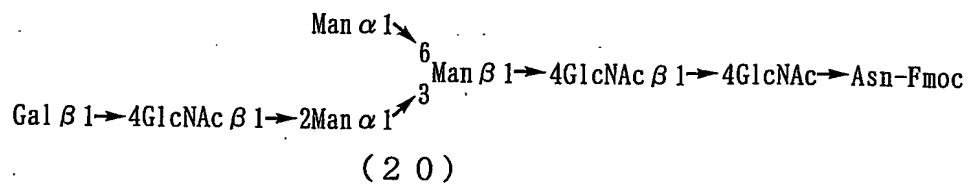
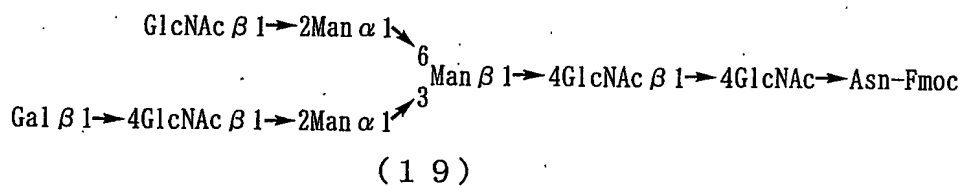
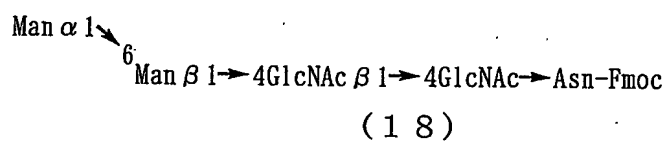
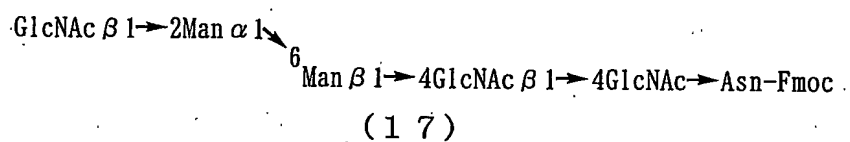
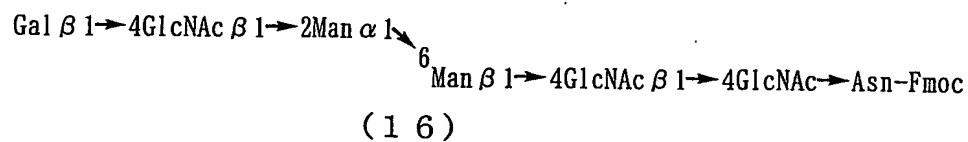


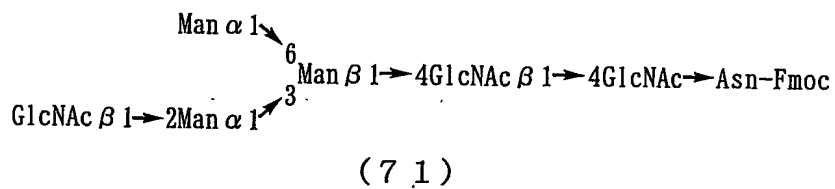
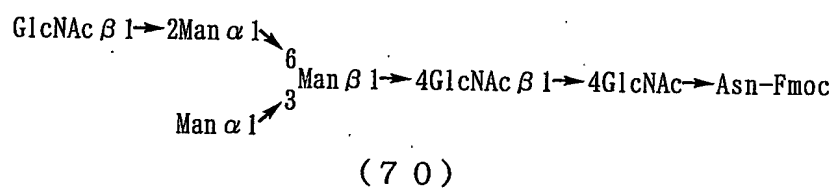
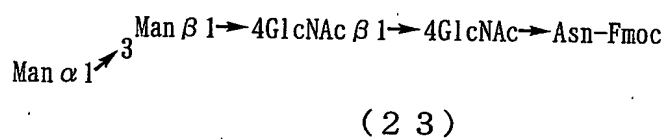
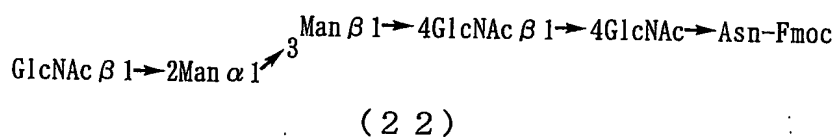
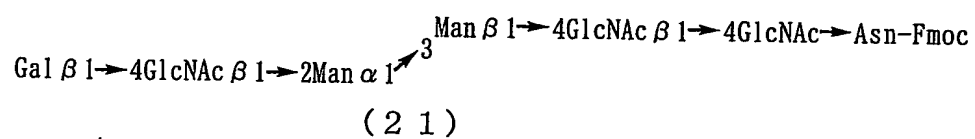
( 1 4 )



( 1 5 )

表 6





### 産業上の利用可能性

本発明によれば、アスパラギンのアミノ基窒素をビオチン化又はF I T C化した糖鎖アスパラギンが得られる。

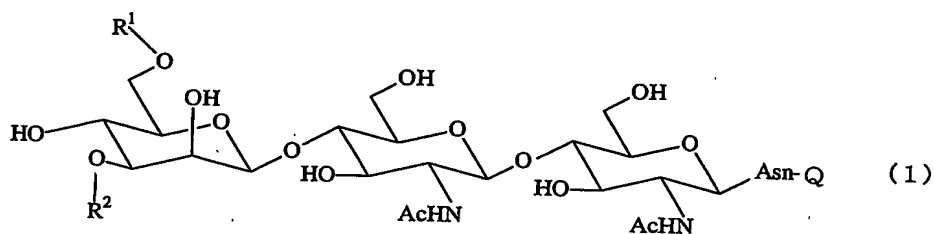
5 更に本発明によれば、ビオチン・アビジンの結合特異性を利用し、ビオチン化した複数の糖鎖をアビジン化されたマイクロプレート上で反応させるだけで簡単に糖鎖マイクロチップを製造することができる。これにより、特定の糖鎖と結合能を有するタンパク質を解明することができる。

10 また、ある特定のタンパク質を分離精製する目的で、アビジン化したアフィニティーカラムに特定のビオチン化した糖鎖を結合し固定化し、そこに、ビオチン化した糖鎖と特異的結合能を有するタンパク質を含む混合物を通すことにより目的とするタンパク質のみを単離することができる。

更に本発明で得られたF I T C化糖鎖アスパラギンは、例えば生体組織中の糖類の受容体の研究、レクチンの糖結合特異性の研究に有用である。

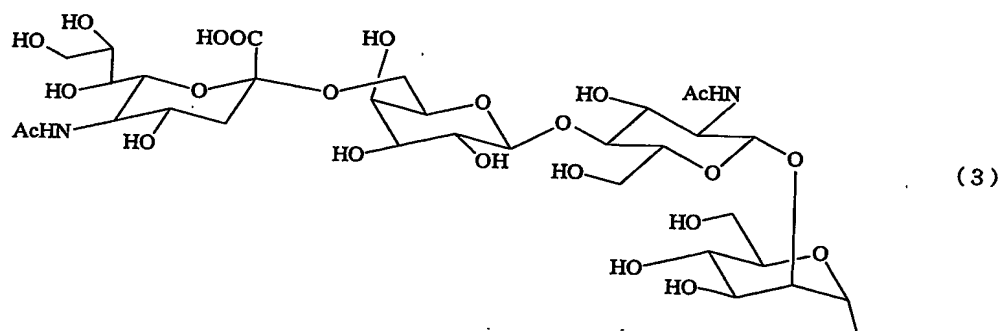
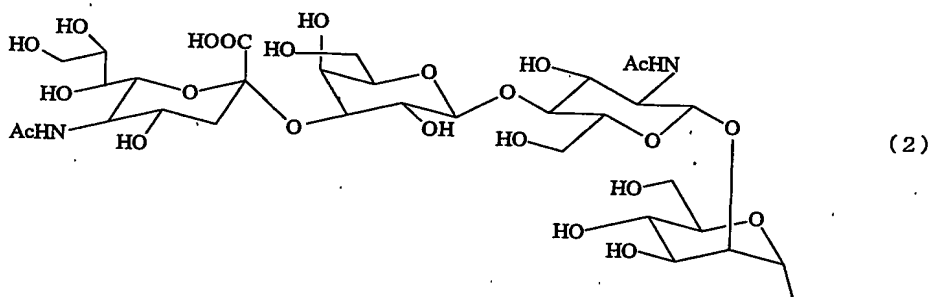
## 請求の範囲

1. 下記式(1)で表される11～3糖を有する糖鎖アスパラギン誘導体。

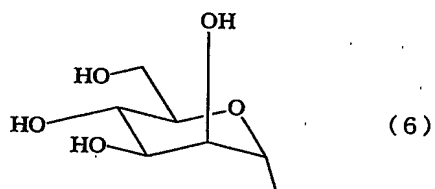
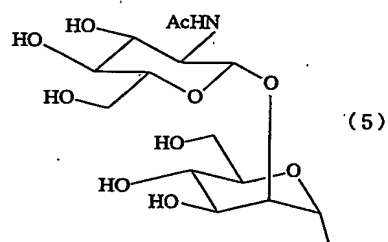
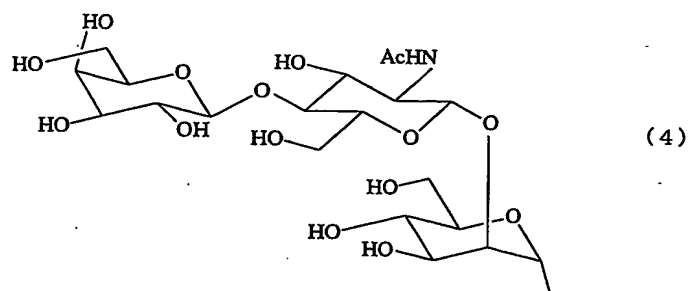


5

〔式中、 $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、式(2)～(6)で示される基であり、同一でも異なってもよい。Qはビオチン基又はFITC基を示す。〕



10



2. 式(1)において、 $R^1$ および $R^2$ の一方は必ず式(2)又は式(3)で示される基である11~7糖を有する( $\alpha 2, 3$ )又は( $\alpha 2, 6$ )糖鎖アスパラギン誘導体。

3. 式(1)において、 $R^1$ は式(2)で示される基であり、 $R^2$ は式(3)で示される基である11糖を有する( $\alpha 2, 3$ )( $\alpha 2, 6$ )糖鎖アスパラギン誘導体。

4. 式(1)において、 $R^1$ は式(3)で示される基であり、 $R^2$ は式(2)で示される基である11糖を有する( $\alpha 2, 3$ )( $\alpha 2, 6$ )糖鎖アスパラギン誘導体。

5. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖

鎖アスパラギンの非還元末端側のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1個以上のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

6. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンが、式(1)で表される11~3糖を有する糖鎖アスパラギン誘導体である請求項5に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

7. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンが、請求の範囲第3項の11糖を有する( $\alpha 2, 3$ )( $\alpha 2, 6$ )糖鎖アスパラギン誘導体である請求項5に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

10 8. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンが、請求の範囲第4項の11糖を有する( $\alpha 2, 3$ )( $\alpha 2, 6$ )糖鎖アスパラギン誘導体である請求項5に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

15 9. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンが、式(1)において $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、式(2)で示される基、または式(4)~(6)で示される基であり、 $R^1$ および $R^2$ の一方は必ず式(2)又は式(4)で示される基である、11~6糖を有する $\alpha 2, 3$ 糖鎖アスパラギン誘導体である請求項5に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

20 10. ビオチン基又はFITC基でアスパラギンのアミノ基窒素が修飾された糖鎖アスパラギンが、式(1)において $R^1$ および $R^2$ は、水素原子、式(3)で示される基、または式(4)~(6)で示される基であり、 $R^1$ および $R^2$ の一方は必ず式(3)又は式(4)で示される基である、11~6糖を有する $\alpha 2, 6$ 糖鎖アスパラギン誘導体である請求項5に記載のフコースを含む糖鎖アスパラギン誘導体。

25 11. 式(7)で表される11~3糖を有する糖鎖アスパラギンをビオチン化することを特徴とするビオチン化糖鎖アスパラギンの製造方法。

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16682

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07H15/26, C08B37/00, G01N30/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07H15/00-15/26, C08B37/00, G01N30/00-30/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SHAO, M.-C. The use of streptavidin-biotinygly cans as a tool for characterization of oligosac charide-binding specificity of lectin., Anal. Biochem., 1992, 205(1), pages 77 to 82; full text	1, 5, 6, 9-11, 13 2-4, 7, 8, 12, 14
X Y	FOURNET, B. et al., Primary structure of an N-glycosidic cabohydrate unit derived from Sophora japonica lectin., Eur.J.Biochem., 1987, 166(2), pages 321 to 324; full text	1, 5, 6, 12 2-4, 7-10
X Y	SHAO, M.-C. et al., Protein matrix effects on glycan processing by mannosidase II and sialyl transferase from rat liver, Biochemistry.1989, 28(9), pages 4077 to 4083; full text	1, 11 2-10, 12-14

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 February, 2004 (13.02.04)

Date of mailing of the international search report

02 March, 2004 (02.03.04)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16682

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SHAO, M.-C. et al., The regulation of glycan processing in glycoproteins. The effect of avidin on individual steps in the processing of biotinylated glycan derivatives., J.Biol. Chem., 1987, 262(7), pages 2973 to 2979; in particular, abstract, Fig. 1	1, 11 2-10, 12-14
Y	LIN, C.-H. et al., Enzymatic synthesis of a sialyl Lewis X dimer from egg yolk as an inhibitor of E-selectin., Bioorg.Med.Chem., 1995, 3(12), pages 1625 to 1630; in particular, Fig. 4	1-14
Y	Ichiro CHIHATA et al., edited by The Japanese Biochemical Society, "Affinitychromatography", Seikagaku Data Book II reduced-size edition, Tokyo Kagaku Dojin, 01 October, 1982 (01.10.82) (2nd edition), pages 1196 to 1212; in particular, table 10-42	14
Y	LETEUX, C. et al., Biotinyl-L-3-(2-naphtyl)-alanine hydrazide derivatives of N-glycans: versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies., Glycobiology, 1998, 8(3), pages 227 to 236	1-14
Y	POOLA, I. et al., Interaction of asparagine-linked oligosaccharides with an immobilized rice ( <i>Oriza sativa</i> ) lectin column., Biochem.J., 1988, 250, pages 117 to 124	1-14
Y	YAMAMOTO, K. et al., Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin., Biochemistry, 1981, 20, pages 5894 to 5899	1-8, 10-14
Y	UNVERZAGT, C., Chemoenzymatic synthesis of a sialylated diantennary N-glycan linked to asparagine., Carbohydrate Res., 1998, 305, pages 423 to 431	1-8, 10-14
Y	HANEDA K. et al., Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the N-acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- $\beta$ -N-acetyltransglucosaminidase., Carbohydrate Res., 1996, 292, pages 61 to 70	1-8, 10-14
Y	UNVERZAGT, C. Building blocks for glycoproteins: Synthesis of the ribonuclease B fragment 21-25 containing and undecasaccharide N-glycan., Tetrahedron Lett., 1997, 38(32), pages 5627 to 5630	1-8, 10-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16682

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SEKO, A. et al., Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk., Biochim.Biophys.Acta., 1997, 1335, pages 23 to 32	1-8,10-14
Y	McGUIRE, J.M. et al., The resolution of the N-linked oligo-saccharides of IgG by high pH anion-exchange chromatography., Carbohydrate Res., 1996, 292, pages 1 to 9	1-14
Y	MEINJOHANN, E. et al., Novel sequential solid-phase synthesis of N-linked glycopolypeptides from natural sources., J.Chem.Soc., Perkin Trans. 1., 1998, 1, pages 549 to 560	1-14
Y	PIERCE-CRETEL, A. et al., Primary structure of N-glycosidically linked asialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk., Eur.J. Biochem., 1984, 139, pages 337 to 349	1-14
Y	CHIESA, M.V. et al., Synthesis of an asparagine-linked heptasaccharide-Basic structure of N-glycans., Eur.J.Org.Chem., 2000, pages 3541 to 3554	1-9,11-14
Y	NOMOTO, H. et al., Preparation and characterization of fragment glycoasparagines from ovalbumin glycoproteins: Reference compounds for structural and biochemical studies of the oligo-mannose and hybrid types of carbohydrate chains of glycoprotein., Carbohydrate Res., 1982, 107, pages 91 to 101	1-8,11-14
Y	BROCKHAUSEN, I. et al., Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharide substrates and HPLC to study the sequential pathway for N-acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V, and VI in the biosynthesis of highly branched N-glycans by hen oviduct membranes., Biochem.Cell. Biol., 1988, 66, pages 1134 to 1151	1-8,11-14
Y	JP 7-224082 A (The Institute of Physical and Chemical Research), 22 August, 1995 (22.08.95), Full text (Family: none)	1-8,11-14
Y	KORNFELD, K. et al., The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins., J.Biol. Chem., 1981, 256(13), pages 6633 to 6640	5-10,13,14
P,Y	WO 03/008431 A1 (Otsuka Chemical Co., Ltd.), 30 January, 2003 (30.01.03), Full text & JP 2003-128703 A	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16682

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest** ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/16682

## Continuation of Box No. II of continuation of first sheet(1)

Claims 1-4 describe an invention relating to sugar-chain asparagine derivatives represented by the general formula (1); claims 5-10 describe an invention relating to sugar-chain asparagine derivative wherein at least one fucose molecule is bonded to the N-acetylglucosamine on the nonreducing end side; claims 11 and 12 describe sugar-chain asparagines represented by the general formula (7) and a process for the production thereof; and claims 13 and 14 describe inventions relating to products to which biotinylated sugar-chain asparagines set forth in claims 1 to 10 are bonded. And, the technical matter common to the inventions of the claims is a compound represented by the general formula (1) in itself.

However, such compounds are publicly known (see documents cited in this international search report, e.g., SHAO, M.-C. Anal. Biochem., 1992, 205(1), pp.77-82), and it is therefore not considered that there is the same or corresponding special technical feature among the inventions.

Thus, this application includes the following two inventions which do not satisfy the requirement of unity of invention:

(a) claims 1-4, 11 and 12 and parts of claims 13 and 14 referring to claims 1-4, and

(b) claims 5-10 and parts of claims 13 and 14 referring to claims 5-10.

### Concerning claims 5, 13 and 14

Although claim 5 describes an invention relating to sugar-chain asparagine derivatives, only N-acetylglucosamine and fucose are disclosed as the particular chemical structures and the structure of the main sugar chain is not limited at all. Further, it is also considered in the sight of the disclosure of the description that only derivatives having the structures of claims 6-10 are disclosed. Thus, the invention of claim 5 is inadequately disclosed in the description or supported by the description, except for derivatives having the structures of claims 6-10. Claim 5 does not satisfy the requirements provided for in PCT Articles 5 and 6.

Therefore, prior art search on claim 5 has been made only about sugar-chain asparagine derivatives having the chemical structures of claims 6-10.

The same applies to claims 13 and 14 referring to claim 5.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07H15/26, C08B37/00, G01N30/48

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>7</sup> C07H15/00-15/26, C08B37/00, G01N30/00-30/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
CAplus (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), JSTPLUS (JOIS), JMEDPLUS (JOIS)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SHA0, M.-C. The use of streptavidin-biotinyglycans as a tool for characterization of oligosaccharide-binding specificity of lectin. Anal. Biochem., 1992, 205(1), pp. 77-82, 全文参照	1, 5, 6, 9-11, 13
Y		2-4, 7, 8, 12, 14
X	FOURNET, B., <i>et al.</i> Primary structure of an <i>N</i> -glycosidic carbohydrate unit derived from Sophora japonica lectin. Eur. J. Biochem., 1987, 166(2), pp. 321-324, 全文参照	1, 5, 6, 12
Y		2-4, 7-10

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 02. 2004

国際調査報告の発送日

02. 3. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

荒木 英 則

4 C

9 7 3 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3450

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	SHAO, M.-C. <i>et al.</i> Protein matrix effects on glycan processing by mannosidase II and sialyl transferase from rat liver, <i>Biochemistry</i> . 1989, 28(9), pp.4077-4083, 全文参照	1, 11
Y		2-10, 12-14
X	SHAO, M.-C. <i>et al.</i> The regulation of glycan processing in glycoproteins. The effect of avidin on individual steps in the processing of biotinylated glycan derivatives. <i>J. Biol. Chem.</i> , 1987, 262(7), pp.2973-2979, 特に要約, 図1	1, 11
Y		2-10, 12-14
Y	LIN, C.-H., <i>et al.</i> Enzymatic synthesis of a sialyl Lewis X dimer from egg yolk as an inhibitor of E-selectin. <i>Bioorg. Med. Chem.</i> , 1995, 3(12), pp.1625-1630, 特に図4	1-14
Y	千畑 一郎ら著, 日本生化学会編, アフィニティクロマトグラフィー, 生化学データブックII縮刷版, 東京化学同人, 1982.10.01 (第2刷), pp.1196-1212, 特に表10・42	14
Y	LETEUX, C., <i>et al.</i> Biotinyl-L-3-(2-naphtyl)-alanine hydrazide derivatives of <i>N</i> -glycans: versatile solid-phase probes for carbohydrate-recognition studies. <i>Glycobiology</i> , 1998, 8(3), pp.227-236	1-14
Y	POOLA, I., <i>et al.</i> Interaction of asparagine-linked oligosaccharides with an immobilized rice ( <i>Oriza sativa</i> ) lectin column. <i>Biochem. J.</i> , 1988, 250, pp.117-124	1-14
Y	YAMAMOTO, K., <i>et al.</i> Structural requirements for the binding of oligosaccharides and glycopeptides to immobilized wheat germ agglutinin. <i>Biochemistry</i> , 1981, 20, pp.5894-5899	1-8, 10-14
Y	UNVERZAGT, C. Chemoenzymatic synthesis of a sialylated di-antennary <i>N</i> -glycan linked to asparagine. <i>Carbohydrate Res.</i> , 1998. 305, pp.423-431	1-8, 10-14
Y	HANEDA K., <i>et al.</i> Transglycosylation of intact sialo complex-type oligosaccharides to the <i>N</i> -acetylglucosamine moieties of glycopeptides by <i>Mucor hiemalis</i> endo- $\beta$ - <i>N</i> -acetyltransglucosaminidase. <i>Carbohydrate Res.</i> , 1996, 292, pp.61-70	1-8, 10-14
Y	UNVERZAGT, C. Building blocks for glycoproteins: Synthesis of the ribonuclease B fragment 21-25 containing and undecasaccharide <i>N</i> -glycan. <i>Tetrahedron Lett.</i> , 1997, 38(32), pp.5627-5630	1-8, 10-14

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	SEKO, A., <i>et al.</i> Occurrence of a sialylglycopeptide and free sialylglycans in hen's egg yolk. <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , 1997, 1335, pp.23-32	1-8, 10-14
Y	McGUIRE, J.M., <i>et al.</i> The resolution of the <i>N</i> -linked oligosaccharides of IgG by high pH anion-exchange chromatography. <i>Carbohydrate Res.</i> , 1996, 292, pp.1-9	1-14
Y	MEINJOHANN, E., <i>et al.</i> Novel sequential solid-phase synthesis of <i>N</i> -linked glycopolypeptides from natural sources. <i>J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1.</i> , 1998, 1, pp.549-560	1-14
Y	PIERCE-CRETEL, A., <i>et al.</i> Primary structure of <i>N</i> -glycosidically linked asialoglycans of secretory immunoglobulins A from human milk. <i>Eur. J. Biochem.</i> , 1984, 139, pp.337-349	1-14
Y	CHIESA, M.V., <i>et al.</i> Synthesis of an asparagine-linked heptasaccharide - Basic structure of <i>N</i> -glycans. <i>Eur. J. Org. Chem.</i> , 2000, pp.3541-3554	1-9, 11-14
Y	NOMOTO, H., <i>et al.</i> Preparation and characterisation of fragment glycoasparagines from ovalbumin glycoproteins: Reference compounds for structural and biochemical studies of the oligo-mannose and hybrid types of carbohydrate chains of glycoprotein. <i>Carbohydrate Res.</i> , 1982, 107, pp.91-101	1-8, 11-14
Y	BROCKHAUSEN, I., <i>et al.</i> Control of glycoprotein synthesis. The use of oligosaccharide substrates and HPLC to study the sequential pathway for <i>N</i> -acetylglucosaminyltransferases I, II, III, IV, V, and VI in the biosynthesis of highly branched <i>N</i> -glycans by hen oviduct membranes. <i>Biochem. Cell. Biol.</i> , 1988, 66, pp.1134-1151	1-8, 11-14
Y	JP 7-224082 A(理化学研究所) 1995.08.22, 全文参照 (ファミリーなし)	1-8, 11-14
Y	KORNFELD, K., <i>et al.</i> The carbohydrate-binding specificity of pea and lentil lectins. <i>J. Biol. Chem.</i> , 1981, 256(13), pp.6633-6640	5-10, 13, 14
PY	WO 03/008431 A1(大塚化学株式会社) 2003.01.30, 全文参照, & JP 2003-128703 A	1-14

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

様式PCT/ISA/210 (特別ページ) を参照のこと。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## 第Ⅱ欄の続き

請求の範囲1から4には、式(1)で表される糖鎖アスパラギン誘導体に関する発明が記載され、請求の範囲5から10には、糖鎖アスパラギン誘導体の非還元末端のN-アセチルグルコサミンに少なくとも1以上のフコースが結合したものに関する発明が記載され、請求の範囲11及び12には、式(7)で表される糖鎖アスパラギン及びその製造方法が記載され、請求の範囲13及び14には、請求の範囲1から10に記載のビオチン化糖鎖アスパラギンを結合させてなる製品に関する発明が記載されている。そして、これらの請求の範囲に係る発明に共通する技術的事項とは、式(1)で表された化合物それ自体であると認められる。

しかしながら、かかる化合物は公知であるから(例えば、SHAO, M.-C. Anal. Biochem., 1992, 205(1), pp. 77-82など、本国際調査報告で引用された各文献を参照のこと。)、かかる技術的事項によってはこれらの発明の間に同一又は対応する特別な技術的特徴があるものとは認められない。

したがって、本願発明には、相互に発明の単一性の要件を満たさない以下の2発明が包含されたものと認められる。

- a) 請求の範囲1から4, 11及び12に係る発明、並びに、請求の範囲13及び14に係る発明のうち請求の範囲1から4を引用するもの
- b) 請求の範囲5から10に係る発明、並びに、請求項13及び14に係る発明のうち請求の範囲5から10を引用するもの

## 請求の範囲5、13及び14について

請求の範囲5には糖鎖アスパラギン誘導体に関する発明が記載されているが、具体的化学構造に関しては、N-アセチルグルコサミンとフコースに関する記載があるのみで、主要な糖鎖構造に関しては何ら限定されておらず、また、明細書の記載をみても、請求の範囲6から10にある構造のものが開示されるのみである。してみれば、かかる請求の範囲及び明細書の記載によっては、請求の範囲5に係る発明のうち、請求の範囲6から10にある構造のもの以外に関して十分に開示されたものではなく、かつ十分な裏付けがなされたものとも認められないから、PCT 5条及び6条に規定する要件を満足しないものとなっている。

したがって、請求の範囲5に係る発明に対する先行技術調査では、糖鎖アスパラギン誘導体の化学構造が請求の範囲6から10に係るものに限定してその対象とした。

また、請求の範囲5を引用する発明である、請求の範囲13及び14に係る発明についても同様である。